

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DETERMINANTE HORMONAL EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL**  
**DE *Dasyllirion cedrosanum* TREL. (TRELEASE, 1911)**

**POR**  
**ERIKA NOHEMI RIVAS MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO Y**  
**ADMINISTRACIÓN DE RECURSOS VEGETALES**

**MAYO, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**DETERMINANTE HORMONAL EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE  
*Dasyllirion cedrosanum* TREL. (TRELEASE, 1911)**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
Con Acentuación en Manejo y Administración de Recursos Vegetales**

**Presenta**

**ERIKA NOHEMI RIVAS MARTÍNEZ**

**Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab**

**Dr. Adalberto Benavides Mendoza**

---

**Director Interno**

---

**Director Externo**

**Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés**

---

**Asesor externo**

**San Nicolás de los Garza, N.L.**

**Mayo, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**DETERMINANTE HORMONAL EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE  
*Dasyllirion cedrosanum* TREL. (TRELEASE, 1911)**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
Con Acentuación en Manejo y Administración de Recursos Vegetales**

**Presenta**

**ERIKA NOHEMI RIVAS MARTÍNEZ**

**Comité de Tesis**

---

**Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab**  
**Director – Presidente**

---

**Dr. Marco A. Alvarado Vázquez**  
**Secretario**

---

**Dr. Adalberto Benavides Mendoza**  
**Director externo**  
**Vocal 1**

---

**Dr. Catalina Rivas Morales**  
**Vocal 2**

---

**Dra. Deyanira Quistián Martínez**  
**Vocal 3**

**San Nicolás de los Garza, N.L.**

**Mayo, 2016**

## AGRADECIMIENTOS

Este Proyecto de Investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto 154682, el cual lleva por título “Análisis Comparativo de Caracteres Genéticas y Fisiológicas hipotéticamente relacionadas a la determinación sexual en sotol (*Dasyilirion cedrosanum*)”.

Se agradece el apoyo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por permitirnos el acceso a las instalaciones y equipos analíticos del Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Horticultura.

**Gracias a las personas que estuvieron apoyándome de una u otra forma para realizar este trabajo:**

- Adrianita por todo tu apoyo, por ser una muy buena tesista y amiga.
- Sr. Fernando, William y a todos los chicos (Floriberto, Leonardo, Juan, etc) que en algún momento me acompañaron a los muestreos, ya que más que un trabajo hicieron cada momento se convirtiera en una divertida aventura.
- Julia por formar parte de este proyecto, hacerme compañía en el laboratorio y sobre todo por ser una muy buena amiga.
- A un gran Ingeniero, Ramón Pérez Schmidt, quién no solo nos dio soporte técnico personalmente, telefónica, por correo y todos las vías por las que podríamos encontrarlo, sino también porque colaboró con sus conocimientos para el desarrollo de metodologías analíticas.
- Sobre todo al Dr. Adalberto Benavides por el apoyo y confianza que me otorgo para realizar este trabajo.

*Si no conozco una cosa, la investigaré.*

*Louis Pasteur (1822-1895)*

*Químico y microbiólogo francés.*

## DEDICATORIA

Es difícil dedicar solo a una persona un trabajo que se ha realizado en más de 3 años, porque en ese tiempo son muchas las personas que de una u otra forma me han apoyado.

Antes que a nadie, este proyecto se lo dedico a mi familia porque siempre me han apoyado en cada una de las decisiones que he tomado. Se los dedico a mis padres y mis hermanos (Sra. María San Juanita Mtz, Sr. Oscar Rivas, Jahaira Rivas y Carlos Rivas) porque han vivido mi ausencia en momentos importantes de su vida, y aun así me han alentado a seguir adelante con todo lo que conlleva trabajar a distancia y por tiempos prolongados.

A mi novio, Roberto, que en todo momento me apoyo y me sigue apoyando, y que siempre me da palabras de aliento y ánimo para culminar con esta etapa de mi vida.

Y por último, a Dios por haberme permitido no derrotarme en los momentos difíciles, en los cuales me dio paciencia y confianza para encontrar una solución.

*Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión,  
de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.*

*Julius Robert Oppenheimer(1904-1967)*

*Físico estadounidense*

***A todos muchas GRACIAS.....***

# ÍNDICE GENERAL

SECCIÓN	CONTENIDO	PÁG.
	<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURAS</b>	<b>i</b>
	<b>RESUMEN</b>	<b>ii</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>iii</b>
	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>3</b>
	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>3</b>
	<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
	<b>Objetivo General</b>	<b>4</b>
	<b>Objetivos Particulares</b>	<b>4</b>
<b>CAPITULO 1.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
<b>1.1.</b>	Evolución floral	<b>5</b>
<b>1.2.</b>	<i>Dasyilirion cedrosanum</i>	<b>6</b>
<b>1.2.1.</b>	Clasificación Botánica	<b>6</b>
<b>1.2.2.</b>	Distribución Geográfica	<b>7</b>
<b>1.2.3.</b>	Requerimientos edáficos	<b>8</b>
<b>1.2.4.</b>	Descripción Morfológica	<b>9</b>
<b>1.2.5.</b>	Usos de las plantas del género <i>Dasyilirion</i>	<b>10</b>
<b>1.3.</b>	<b>DETERMINACIÓN SEXUAL EN PLANTAS</b>	<b>12</b>
<b>1.4.</b>	<b>ESTUDIOS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL</b>	<b>13</b>
<b>1.4.1.</b>	Marcadores moleculares	<b>13</b>
<b>1.4.2.</b>	Genes y cromosomas relacionados al sexo	<b>14</b>
<b>1.4.3.</b>	Efecto de las fitohormonas en el desarrollo y diferenciación floral	<b>15</b>
<b>1.4.3.1.</b>	Clasificación y función de las fitohormonas en el desarrollo de las plantas	<b>15</b>

1.4.3.2.	Control del desarrollo floral y diferenciación sexual por fitohormonas	18
1.5.	<b>FACTORES EXTERNOS EN LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN PLANTAS</b>	21
<b>CAPITULO 2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
	<b>ETAPA I. Selección de la técnica de extracción y estandarización de los métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de GA4 y tZR</b>	24
2.1.	Estandarización de la técnica de extracción para GA4 y tZR	24
2.1.1.	Estandarización de la metodología cromatográfica para la cuantificación de GA4 y tZR	25
	<b>ETAPA II. Cuantificación de GA4 y tZR en plantas adultas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i></b>	26
2.2.	Descripción de las localidades de muestreo	26
2.2.1.	Geoposicionamiento de plantas pistiladas y estaminadas de <i>D. cedrosanum</i>	27
2.2.2.	Diseño de muestreo y colecta de tejidos vegetales	28
2.2.3.	Almacenamiento de la Muestra	29
2.2.4.	Extracción de Giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina	29
2.2.5.	Determinación de Giberelina A4 por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	30
2.2.6.	Determinación de ribósido de trans-zeatina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	31
	<b>ETAPA III. Balance de GA4/tZR y su efecto en la determinación del sexo en plantas adultas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i></b>	31
2.3.	Estimación del balance GA4/tZR	31
2.4	<b>Diseño Experimental</b>	32
2.5	<b>Análisis Estadístico</b>	32
<b>CAPÍTULO 3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	33
	<b>ETAPA I. Selección de la técnica de extracción y estandarización de los métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de GA4 y tZR</b>	33

3.1	Estandarización de la técnica de extracción para GA4 y tZR	33
3.2.	Estandarización de la metodología cromatográfica para la cuantificación de GA4 y tZR	34
	<b>ETAPA II. Cuantificación de GA4 y tZR en plantas adultas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i></b>	34
3.3.	Concentraciones de GA4 en órganos de plantas pistiladas y estaminadas <i>D. cedrosanum</i>	35
3.4.	Concentraciones de tZR en órganos de plantas pistiladas y estaminadas <i>D. cedrosanum</i>	36
	<b>ETAPA III. Balance de GA4/tZR y su efecto en la determinación del sexo en plantas adultas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i></b>	38
3.5.	Determinación del balance de GA4/tZR en diferentes órganos de plantas pistiladas y estaminadas de <i>D. cedrosanum</i>	38
3.6.	Análisis de la interacción entre los factores sexo, órgano y localidad para GA4, tZR y el balance de GA4/tZR	39
<b>CAPÍTULO 4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	43
	<b>ETAPA I. Selección de la técnica de extracción y estandarización de los métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de GA4 y tZR</b>	43
4.1.	Estandarización de la técnica de extracción para GA4 y tZR	43
4.2.	Estandarización de la metodología cromatográfica para la cuantificación de GA4 y tZR	43
	<b>ETAPA II. Cuantificación de GA4 y tZR en plantas adultas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i></b>	44



4.3.	Concentraciones de GA4 y tZR en órganos de plantas pistiladas y estaminadas de <i>D. cedrosanum</i>	44
4.4.	Análisis del efecto de la interacción de los factores de sexo, órgano y localidad sobre la concentración de GA4 y tZR	48
	<b>ETAPA III. Balance de GA4/tZR y su efecto en la determinación del sexo en plantas adultas de <i>Dasyllirion cedrosanum</i></b>	<b>48</b>
4.5.	Relación del balance de GA4/tZR en la determinación del sexo en <i>Dasyllirion cedrosanum</i>	48
<b>CAPÍTULO 5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO 6.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>
	<b>RESUMEN BIOGRÁFICO</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

SECCIÓN	CONTENIDO	PÁG.
1	Relación entre el diámetro y el peso promedio del tallo o corona.	10
2	Funciones Fisiológicas de las Fitohormonas durante las diferentes etapas de desarrollo de una planta.	17
3	Técnicas reportadas en literatura para la extracción de Giberelinas y Citocininas.	24
4	Métodos cromatográficos reportados en literatura para cuantificar Giberelinas y Citocininas.	25
5	Valores bajos y altos evaluados en los parámetros cromatográficos	26
6	Coordenadas de las plantas muestreadas en la localidad del Cañón de San Lorenzo.	27
7	Coordenadas de las plantas muestreadas en la localidad de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.	28
8	Coordenadas de las plantas muestreadas en la localidad de General Cepeda.	28
9	Estandarización de la técnica para la extracción de fitohormonas.	33
10	Estandarización de metodología para cuantificación de fitohormonas por HPLC.	34
11	MANOVA correspondiente a la evaluación de GA4 (Prueba de $\lambda$ de Wilks).	35
12	Media y Error Estándar de la concentración de GA4 (mg/g de peso seco) en plantas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i> .	36
13	MANOVA correspondiente a la evaluación de tZR (Prueba de $\lambda$ de Wilks).	36
14	Media y Error Estándar de la concentración de tZR (mg/g de peso seco) en plantas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i> .	37
15	MANOVA correspondiente a la evaluación del balance de GA4/tZR (Prueba de $\lambda$ de Wilks).	38
16	Media y Error Estándar de los valores del Balance GA4/tZR (mg/g de peso seco) en plantas de <i>Dasyilirion cedrosanum</i> .	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

SECCIÓN	CONTENIDO	PÁG.
1	Distribución geográfica del género <i>Dasyllirion</i> (Olhagaray, 1994).	7
2	Recolección de la planta <i>Dasyllirion</i> por Indios del Norte de México y Sur de Estados Unidos (Zappler <i>et al.</i> , 1996).	10
3	Estructura química de las Fitohormonas.	16
4	Esquema General de las Etapas Metodológicas.	23
5	Comparación del efecto de la interacción de los factores sexo, órgano y localidad sobre la media y el error estándar de la concentración de GA4 en plantas de <i>D. cedrosanum</i> .	40
6	Comparación del efecto de la interacción de los factores sexo, órgano y localidad sobre la media y el error estándar de la concentración de tZR en plantas de <i>D. cedrosanum</i> .	41
7	Comparación del efecto de la interacción de los factores sexo, órgano y localidad sobre la media y el error estándar de los valores del balance de GA4/tZR en plantas de <i>D. cedrosanum</i> .	42

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

### SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
g	Gramos
h	Hora
L	Litro
mBar	milli Bares
mL	Mililitro
min	Minuto
pH	Potencial de Hidrógeno
pmol	Picomol
rpm	Revoluciones por minuto
v/v	Volumen/volumen

### ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of Variance (Análisis de Varianza)
C	Corona
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CSL	Cañón de San Lorenzo
DMS	Diferencia Mínima Significativa
E	Estaminada
GA	Giberelina A
GA4	Giberelina A4
GC	General Cepeda
H	Hoja
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Inflorescencia
LSD	Least Significant Difference
msnm	Metros Sobre el Nivel del Mar
N	Narro
P	Pistilada
tZR	Ribósido de trans-zeatina
UAAAN	Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
GA4/tZR	Giberelina A4/ Ribósido de trans-zeatina
UV	Ultravioleta

## RESUMEN

*Dasyllirion cedrosanum* es una planta ampliamente distribuida en el norte de México y suroeste de los Estados Unidos, cuya importancia se basa en la fermentación de su corona para la elaboración de una bebida alcohólica cuya designación de origen es “Sotol”. Existe poco conocimiento concerniente a los mecanismos de diferenciación sexual de esta especie, lo que conduce a la falta de propuestas no solo para su conservación y reforestación, sino también, de los mecanismos que nos permitan determinar la naturaleza de la planta. Las fitohormonas han sido asociadas con la diferenciación sexual en plantas dioicas, porque, individualmente o en combinación, estas hormonas promueven la masculinización o feminización de sus estructuras sexuales. El objetivo de este estudio fue cuantificar los niveles de giberelina A4 (GA4) y ribósido de trans-zeatina (tZR) en muestras de diferentes órganos de plantas estaminadas y pistiladas de *D. cedrosanum*, las cuales fueron colectadas en diferentes etapas del desarrollo floral. El material vegetal fue obtenido mediante un muestreo dirigido en donde las plantas a seleccionar debían tener una inflorescencia de reciente emergencia. Las plantas fueron colectadas en tres localidades del Estado de Coahuila, México. Las giberelinas A4 (GA4) y la ribósido de trans-zeatina (tZR) fueron cuantificadas mediante un CLAR-UV a 205nm y 268nm, respectivamente. Los datos de GA4, tZR y del balance de fitohormonas (GA4/tZR) fueron analizados mediante un MANOVA con mediciones repetidas ( $p \leq 0.05$ ), y posteriormente, se analizaron las diferencias entre factores con una prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (DMS) ( $p \leq 0.05$ ). Los resultados obtenidos durante la posterior aparición del polen y las semillas, muestran que no hubo diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) en las concentraciones de GA4 cuantificadas en los tejidos de la corona y hojas, sin embargo, estos dos tejidos mostraron valores más altos de la hormona comparados con los cuantificados en la inflorescencia. No hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los niveles de tZR entre plantas de diferente sexo. Entre órganos, las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) solo fueron encontradas durante la emergencia y muerte de la inflorescencia, etapas durante las cuales la corona presentó los niveles más altos de tZR. Los resultados para el balance GA4/tZR fue similar a lo reportado para GA4. La GA4 probablemente juega un papel en la determinación sexual en *D. cedrosanum* debido a que su presencia está asociada con la aparición de flores estaminadas.

## ABSTRACT

*Dasyilirion cedrosanum* is a plant widely distributed across Northern Mexico and Southwestern United States, whose importance is based on the fermentation of the pineapple for the production of an alcoholic beverage with designation of origin "Sotol". There is little knowledge concerning the sexual differentiation mechanisms of this species, which leads to a lack of proposals for not only its conservation and reforestation, but also, mechanisms that allow us to determine the dioecious nature of the plant. Phytohormones have been associated with sexual differentiation in dioecious plants, because, individually or in combination, these hormones promote masculinization or feminization of their sexual structures. The objective of this study was to quantify gibberellin A4 (GA4) and trans-zeatin riboside (tZR) levels in samples of different organs of staminate and pistillate plants of *D. cedrosanum*, which were collected at different stages of floral development. The plant material was obtained by directed sampling where the plants to select must have an inflorescence of recent emergency. The plants were collected in three locations in Coahuila State, Mexico. Gibberellin A4 (GA4) and trans-zeatin riboside (tZR) were quantified by HPLC-UV at 205nm and 268nm, respectively. The average values of GA4, TZR and phytohormone balance (GA4 / TZR) were analyzed by MANOVA with repeated measures ( $p \leq 0.05$ ), later, the differences between factors were analyzed by the test of Fisher's least significant difference (LSD) ( $p \leq 0.05$ ). The results obtained during the subsequent emergence of pollen and seeds, show no statistical difference ( $p \leq 0.05$ ) in the concentrations of GA4 quantified in the tissues of the crown and leaves, however, these two tissues showed higher values of GA4 compared with quantified in the inflorescence. During the later appearance of pollen and seeds, the GA4 levels in the crown and leaves were the same but exceeded the levels of the inflorescence. There were no significant differences ( $p \leq 0.05$ ) in the levels of TZR between plants of different sexes. Among organs, significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were only found during inflorescence emergence and death, stages during which the crown presented the highest levels of tZR. The results for the GA4/tZR ratio were similar to those reported for GA4. GA4 likely plays a role in sexual determination in *D. cedrosanum* because its presence is associated with the appearance of staminate flowers.

## INTRODUCCIÓN

La determinación del sexo es un proceso que conduce a la diferenciación de los órganos o células que producen los gametos, es decir, es una separación física de estructuras productoras de gametos femeninos y masculinos en diferentes individuos de una especie (Juárez y Banks, 1998; Tanurdzic y Banks, 2004). Existe una gran variación en dónde, cuándo y cómo se produjo dicha separación, de la cual, se originaron plantas monoicas y dioicas (Juarez y Banks, 1998). A pesar de que aproximadamente tres cuartas partes de las familias botánicas con flores incluyen especies dioicas (Ainsworth, 2000), poco se conoce sobre la base genética de este evento que se cree es de reciente evolución; así como, de los factores bioquímicos que participan en dicho proceso evolutivo (Negrutiu *et al.*, 2001; Vyskot y Hobza, 2004). Hay un gran número de plantas dioicas de importancia comercial, dentro de ellas encontramos al género *Dasyllirion*, ya que a partir de la corona de algunas de sus especies (*D. duranguense*, *D. wheeleri*, y *D. cedrosanum*) se obtienen extractos ricos en azúcares, los cuales una vez fermentados da como producto final una bebida alcohólica conocida como “Sotol”.

La elaboración artesanal de la bebida de Sotol ha llevado a la colecta indiscriminada de la planta, lo cual aunado a la escasa información sobre la biología y las características de reproducción de este género ha contribuido a un mal manejo de las poblaciones naturales. Por tal razón, se considera necesario establecer viveros con especies de *Dasyllirion* para posteriormente destinarlas al trasplante en zonas naturales considerando las proporciones adecuadas de plantas estaminadas y pistiladas que garanticen el éxito de una futura reproducción. No obstante, para ello es necesario conocer el sexo en las plantas jóvenes, lo cual solo es posible hasta que emerge por primera vez la inflorescencia (escapo), hecho que ocurre cuando el individuo tiene aproximadamente 15 años de edad y ya adquirido un gran tamaño, con lo cual el trasplante no es posible desde un punto de vista práctico.

No obstante, la morfología no es la única herramienta de la que se pueda hacer uso para la distinción del sexo en las plantas. Algunos reportes indican que los factores determinantes en la diferenciación sexual en plantas dioicas se asocian con la presencia de marcadores macromoleculares específicos para estambres o carpelos, genes ligados al

sexo, cromosomas homomórficos X y Y, o bien, la presencia de compuestos bioquímicos propios de la planta, como las fitohormonas (Durnad y Durnad, 1984; Ming *et al.*, 2007; Soldatova y Khryanin, 2010). La función de las fitohormonas en la expresión sexual ha sido estudiada en especies tanto monoicas como dioicas (Durand y Durand, 1984), destacándose el papel de las giberelinas (Giberelina A3, A4 y A7) y de las citocininas (trans zeatina y ribósido de trans-zeatina) debido a que existen múltiples reportes relacionados con la influencia de éstas dos fitohormonas en la masculinización y feminización de diversas plantas, como lo son: *Buchloe dactyloides* (Yin y Quinn, 1995a), *Cucumis sativus* (Yin y Quinn, 1995b), *Mercurialis annua* (Boissay *et al.*, 1996), *Zea mays* L. (Zhao *et al.*, 1999) y *Cannabis sativa* L. (Soldatova y Khryanin, 2010).

Debido que para el género *Dasyilirion* no existen reportes científicos que indiquen cuales son los factores genéticos o bioquímicos involucrados en su diferenciación sexual, es imposible distinguir entre plantas jóvenes estaminadas y pistiladas (Cruz *et al.*, 2013) lo que conlleva a que la implementación y manejo de viveros para la conservación de este género sea poco viable. De acuerdo al problema planteado y a lo reportado en la literatura, el objetivo del presente trabajo se centró en la cuantificación de GA4 y tZr en diferentes órganos de plantas adultas pistiladas y estaminadas de *Dasyilirion cedrosanum* colectadas en tres regiones del estado de Coahuila, con la finalidad de establecer si hay un efecto individual o combinado (Balance de GA4/tZR) de estas fitohormonas en la diferenciación sexual de la planta.



## JUSTIFICACIÓN

*Dasyilirion cedrosanum* es una especie que ocupa una gran superficie del estado de Coahuila, la cual es considerada una de las escasas fuentes de ingresos económicos para habitantes de las zonas semiáridas de dicha región. Sin embargo, los ingresos originados a partir de esta especie se basan en la sobreexplotación de la planta para la elaboración de una bebida alcohólica conocida como “Sotol”.

El mal uso de este recurso natural ha despertado un creciente interés por la implementación de estudios que originen conocimiento básico sobre la biología reproductiva de la especie.

Es por ello, que el presente trabajo de investigación se enfocó en uno de los factores que influyen en la diferenciación sexual de las plantas, es decir, en el análisis del contenido relativo de dos fitohormonas (Giberelina A4 y Ribósido de trans-Zeatina), las cuales pudieran tener un papel importante en la determinación del sexo en *Dasyilirion cedrosanum*.

Dicha investigación se ve impulsada por la falta de programas para el manejo de la planta, así como, por la poca información existente sobre su reproducción y diferenciación sexual. La finalidad del trabajo es la de obtener información de relevancia para ser utilizada en la mejora de los proyectos de reforestación de la especie en el Estado de Coahuila, así como, para la implementación de viveros, cuyas plantas puedan destinarse para la elaboración de la bebida alcohólica característica de esta especie.

## HIPÓTESIS

La diferenciación sexual de la planta dioica *D. cedrosanum*, está influida por la presencia de las fitohormonas Giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina y la concentración relativa de éstas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Dilucidar la participación de las hormonas Giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina en la diferenciación sexual de *Dasyllirion cedrosanum* Trel.

### Objetivos Particulares

1. Implementar técnicas cromatográficas para la determinación de Giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina.
2. Cuantificar el contenido de Giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina en hoja, corona y escapo de plantas adultas machos y hembras de *Dasyllirion cedrosanum*, localizados en tres regiones del Estado de Coahuila.
3. Establecer si hay diferencias en los niveles de Giberelina A4, ribósido de trans-zeatina y/o en el balance resultante de GA4/tZR, entre sexos, órganos y localidades evaluados.
4. Establecer si existe una participación de las fitohormonas en la determinación del sexo en plantas de *D. cedrosanum*, y si dicha participación, ocurre por efectos individuales o por el balance de GA4/tZR.

## 1. ANTECEDENTES

La determinación del sexo es un proceso que conduce a la diferenciación de los órganos o células que producen los gametos, es decir, es una separación física de estructuras productoras de gametos femeninos y masculinos en los diferentes individuos de una especie. En plantas hay una gran variación en dónde, cuándo y cómo se produce dicha separación (Juarez y Banks, 1998; Tanurdzic y Banks, 2004), de lo cual se originan plantas monoicas y dioicas.

### 1.1 Evolución floral

Las plantas con flores (Angiospermas) empezaron a aparecer en los registros fósiles de un mínimo de 124.6 millones de años atrás (Ming *et al.*, 2007). Aproximadamente el 90% de todas las especies de angiospermas tienen flores perfectas (hermafroditas) con órganos especializados produciendo microsporas o megasporas que los gametofitos masculinos o femeninos desarrollan. De las especies restantes, aproximadamente la mitad son monoicas, produciendo flores unisexuales de ambos sexos en el mismo individuo, y la otra mitad son dioicas, con flores machos y hembras unisexuales que surgen en individuos separados (Tanurdzic y Banks, 2004; Yampolsky y Yampolsky, 1922). La distribución de plantas dioicas y monoicas en el árbol filogenético de las angiospermas favorece fuertemente el escenario evolutivo en el que las flores unisexuales evolucionaron a partir de las flores perfectas (hermafroditas o bisexuales) en el linaje de los angiospermas (Lebel y Grant, 1977; Charlesworth, 2002).

Este es un proceso evolutivo de las plantas, en el cual se han desarrollado diversos mecanismos para promover la polinización cruzada por medio de la producción de flores pistiladas o estaminadas unisexuales en la misma (monoica) o diferente (dioica) planta, representando estas dos formas de evolución floral el 4% y 7% de la población de plantas, respectivamente (Dellaporta y Calderón, 1993).

A pesar de que las especies con reproducción sexual sólo tiene tres opciones posibles ante mencionadas: relegar a los dos sexos en individuos separados (dioicos), mantenerlos juntos en el mismo individuo (monoico), o tener una combinación de ambos

en la misma flor (hermafroditas), las plantas en particular exhiben una gran variedad de fenotipos sexuales (Tanurdzic y Banks, 2004). Tan solo dentro de las plantas monoicas existe una agrupación en dos categorías diferentes: aquellas que sólo producen flores unisexuales masculinas y femeninas en la misma planta, y las que producen tanto en flores unisexuales y perfectas en la misma planta (Tanurdzic y Banks, 2004).

Muchas de las plantas dioicas resultantes de la evolución de las angiospermas son de gran valor comercial por la producción de frutos, tales como papaya y kiwi, o de semillas como pistacho, nuez moscada y pimienta negra, por lo que se prefieren en altas proporciones en un cultivo (Parasnis *et al.*, 2000; Ainsworth, 2000), dentro de estas plantas de importancia comercial se destaca la aparición de una especie que se distribuye en zonas semiáridas del estado de Coahuila, conocida como *Dasyilirion cedrosanum* o la planta del sotol.

## **1.2. *Dasyilirion cedrosanum***

Una de las especies dioicas de gran importancia en el norte de México por su uso para la elaboración de una bebida alcohólica de importancia económica e histórica de la zona es la planta del género *Dasyilirion*, los individuos de este género son plantas monocotiledóneas y dioicas, las cuales han sido ubicado en diferentes familias botánicas.

El término *Dasyilirion* dado como nombre a la planta debe su origen a la fusión de los términos griegos “*Dasy*” (grueso o denso) y “*lirion*” (lirio blanco), que hacen alusión a la disposición compacta de la inflorescencia (Zuccarini, 1838).

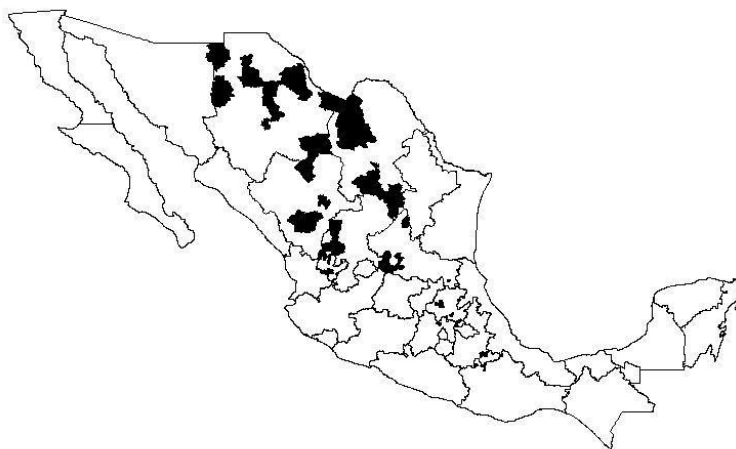
### **1.2.1. Clasificación Botánica**

*Dasyilirion* ha sido ubicado dentro de las familias *Liliaceae* (Standley, 1920), *Amaryllidaceae*, *Agavaceae* (Hutchinson, 1934; Cronquist, 1981) y *Nolinaceae* (Dahlgren *et al.*, 1985). Sin embargo, recientemente este género ha sido ubicado dentro de la familia *Asparagaceae* y la subfamilia *Nolinaceae* (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, GRIN, 2013).

### 1.2.2. Distribución Geográfica

*Dasyilirion* cuenta con 16 especies distribuidas a lo largo del norte de México y suroeste de los Estados Unidos (López, 2005). De acuerdo a Bogler (1994), en México existen 14 especies de este género las cuales son: *Dasyilirion ecotrichum*; *D. glaucophyllum* (estado de México.); *D. graminifolium*; *D. inermis*; *D. parrianum* (San Luis Potosí); *D. leiophyllum* (Chihuahua y oeste de Coahuila); *D. longissimum*, (Estado de México); *D. miquihuanense* (Tamaulipas); *D. serratifolium* (sureste de México); *D. simplex* (Durango, México); *D. texanum* (norte de Coahuila); *D. texanum* var. *Avernas* (Estado de México); *D. wheeleri* (Sonora, Chihuahua y Durango); *D. cedrosanum* (centro y sur de Coahuila); *D. heteroteca* (norte de Coahuila).

El área de distribución de las poblaciones naturales de sotol en México (**Figura 1**) se encuentra ubicada dentro la zona fisiográfica del Altiplano Mexicano: Coyame, Janos, General Trías, Manuel Benavides, Buenaventura, Jiménez y Dr. Belisario Domínguez, en el estado de Chihuahua; Ocampo, Parras y Saltillo, en Coahuila; Hidalgo y Peñón Blanco, en Durango; Tepotzotlán, Estado de México; Ixmiquilpan, Pachuca de Soto, Tasquillo y Tepeapulco, en Hidalgo; Bolaños, Jalisco; Concepción Buenavista y San Mateo Tlapiltepec, en Oaxaca; Tehuacán, en Puebla; Cedral, Coxcatlan, Mexquitic de Carmona, San Luis Potosí y Villa de Arriaga, en San Luis Potosí; Concepción de Oro, Pinos, Sombrerete y Valparaíso, en Zacatecas (Olhagaray, 1994).



**Figura 1.** Distribución geográfica del género *Dasyilirion* en México (Olhagaray, 1994).

La distribución de *Dasyilirion cedrosanum* cubre la zona del Altiplano Mexicano entre la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental, desarrollándose desde los estados de Zacatecas, en la región de Cedros hasta el estado de Coahuila, en la cual podemos observar poblaciones naturales en el municipio de Saltillo y La Angostura; a veinte kilómetros al sur de Ocampo, en el Aguaje del Pajarito, en el extremo occidental de la sierra de La Fragua; al norte del Puerto Colorado, en el municipio de Monclova, en la localidad del Puerto de San Lorenzo, en el rancho La Luz, en la sierra de Paila y en el Cañón de San Lorenzo (Bogler, 1994; Zuccarini, 1838).

### **1.2.3. Requerimientos edáficos**

La planta puede ser encontrada a una altura de 950-2000 msnm sobre pendientes ligeras o moderadas de 8-16% y laderas rocosas de montañas aisladas o arroyos, así como en pastizales y matorrales desérticos rosetófilos del centro y sur del estado de Coahuila, la planta generalmente se limita a crecer en suelos de grava o tipo caliza con buen drenaje; por encima de suelos más finos, suelos compactados de cuencas o planos (Bogler, 1994).

Los factores edáficos que conforman la distribución de *Dasyilirion* corresponden a Xerosoles, Rendzinas y Regosoles, con una gran riqueza en carbonatos de calcio, delgados, con poco desarrollo de horizontes de suelo, con buen drenaje y aireación (Zarate, 2003).

Los sitios de mayor potencial son aquellos que se encuentran en exposición sur y los menos favorables se encuentran ubicados en terrenos de mayor humedad y menor insolación, como las que se encuentran en exposición norte (Bogler, 1994). La composición del suelo también influye en gran medida para el desarrollo de plantas de esta especie, destacándose suelos con bajo contenido de materia orgánica, alta pedregosidad (Bogler, 1994).

La planta del sotol se distribuye en un rango de temperaturas medias que va desde los 17 a los 21 °C y en un rango de precipitación media anual de 150 a 400 mm (Zarate, 2003).

#### 1.2.4. Descripción Morfológica

*Dasyilirion cedrosanum*. Es una planta con semejanzas a algunas otras especies de *Dasyilirion*, ésta se describe como un arbusto perenne, policárpico, de raíces con diámetro de 2-8mm.

Las hojas son lineales, fibrosas, glabras, difundidas, superpuestas y persistentes, poseen una base amplia y forma de cuchara, con alrededor de 20 mm de ancho y más de un metro de largo, con las puntas ligeramente apinzeladas, glaucas, con la quilla ligeramente áspera, y márgenes curvos con espinas afiladas y un apéndice fibroso. Las espinas de las hojas son distantes entre sí de 10-15mm y de 2-5mm de largo, de color amarillo y rojizo hacia la punta (Robles y España, 2008).

Esta especie tiene numerosas hojas que se acomodan en forma de rosetas, dando origen a la corona, cuyo peso tiene una variación de acuerdo a la edad y diámetro del tallo (**Cuadro 1**). A partir de la corona emerge un tallo alargado frecuentemente compuesto de troncos erectos o reclinados que va de 1-1.5 m de alto, a partir del cual, se desarrollara la inflorescencia.

El escapeo floral o inflorescencia es paniculada, leñosa, lanceolada, con panículas estrechas, pedúnculos largos y brácteas semejantes a las hojas proximales, su altura llega a los 5 metros (Benavides *et al.*, 2010). Forman fascículos de densos racimos en axilas de las brácteas. Sus flores son pequeñas, funcionalmente unisexuales. Algunas plantas tienen solo flores machos, y otras solo flores hembra. Las flores son brácteas, laciniada, membranosas, de 6 tépalos, blanquecinas, verdosas o púrpuras, ovaladas, con márgenes denticulados. Las flores estaminadas (masculinas) cuentan con 6 estambres rudimentarios; mientras las flores pistiladas (femeninas) están provistas de un ovario superior en 3 ángulos, abortivos en las flores de estilo corto, en forma de correa, y ligeramente amplio en la punta; el estigma es trilobulado, los *lóbulos* son débilmente connados en un tubo, pedicelo de las flores pistiladas auriculares.

Los frutos son elípticos, capsulares y angostos de 4-5mm por 7-9mm, con un lóculo, seco, indehiscente, con 3 alas. Como la planta puede contener una gran cantidad de estructuras florales hace suponer que pueden generarse una cantidad considerable de semillas; sin embargo, el polen tiene que transportarse por el viento para llegar a los

pistilos de una planta hembra, proceso en el cual se pierden muchas células gaméticas masculinas, lo que reduce la producción de semillas (Bogler, 1994; Olhagaray *et al.*, 2004).

<b>Cuadro 1. Relación entre el diámetro y el peso promedio del tallo o corona.</b>	
<b>Diámetro de las coronas (cm)</b>	<b>Peso promedio (kg)</b>
18-25	13-16
26-35	20-26
36-45	32-40
46-55	47-56
56-65	66-77

**Fuente:** Zárate, 2003.

### 1.2.5. Usos de las plantas del género *Dasyilirion*

Hoy en día se conoce que para los Indios nativos del Suroeste del desierto de Estados Unidos y Norte de México, esta planta constituía una de las principales fuentes de alimentos (De La Garza *et al.*, 2008; López, 2005), debido a que consumían el bulbo después de ser asado en pozos con roca y molido dentro de una pasta (**Figura 2**).



**Figura 2.** Recolección de la planta *Dasyilirion* por Indios del Norte de México y Sur de Estados Unidos (Zappler *et al.*, 1996).



Por otra parte, algunas especies de *Dasyllirion* como: *D. duranguense*, *D. wheeleri* y *D. cedrosanum* son consideradas de gran importancia económica ya que desde la llegada de los colonizadores españoles han sido utilizadas para elaboración de un destilado a partir de la cocción de la corona de estas plantas (De La Garza *et al.*, 2008). El proceso de elaboración del destilado se llevaba a cabo sometiendo a la corona de la planta macho o hembra a una cocción en un horno que consistía en un pozo con piedras, posterior a lo cual se realizaba la molienda de la corona cocida con lo que se conseguían extractos ricos en azúcares, éstos finalmente eran fermentados por las levaduras nativas de la planta obteniéndose una potente bebida alcohólica propia de las regiones donde se desarrolla la planta; dicha bebida es conocida con diversos nombres entre ellos: “sereque” “sotol”, o “zotol” (Bogler, 1994; López, 2005). La bebida alcohólica obtenida de *D. cedrosanum* recibió la denominación de origen “sotol” el día 8 de agosto del año 2002 (NOM-159-SCFI-2004). Dentro de las tres especies empleadas en la producción del sotol *D. cedrosanum* Trel., es la especie que se desarrolla en gran parte del territorio de Coahuila y sus alrededores, y es por ello, que en esta región del país es de gran importancia su preservación (López, 2005).

Otros usos dados a las plantas de sotol se centran en el empleo de las hojas para hacer esteras, cestos, cuerdas, pajas y papel (Bogler, 1994). Diversas especies de la planta de sotol son cultivadas como plantas ornamentales (Vines, 1960).

El empleo desmedido de la planta principalmente para la producción de la bebida llamada sotol ha conducido a la sobreexplotación de ésta, lo que aunado a la escasa información que es proporcionada a los productores del sotol ha contribuido a su actual estado de deforestación. Adicional a esto la casi nula investigación sobre esta especie, y por lo tanto, la escasa literatura científica existente han encaminado a una divulgación deficiente sobre las características de reproducción y prácticas de forestación de *Dasyllirion*, lo que repercute en un pobre manejo de las plantas silvestres de este género, que se refleja en el bajo reclutamiento en las poblaciones naturales.

Es por ello que se cree que el desarrollo y uso de técnicas para la determinación temprana del sexo en las plantas de sotol, permitiría el adecuado manejo del balance entre plantas macho y hembra, aumentando las posibilidades de reproducción, y por consiguiente se pretende inducir mejoras en los esfuerzos de conservación. Sin embargo,

en muchas especies dioicas el sexo no es revelado sino, hasta alcanzar la madurez, cuando aparecen las flores, lo cual puede tomar de meses a años. Este hecho ha generado un interés por desarrollar estrategias de identificación del sexo de plantas (Giraldo *et al.*, 2004). Actualmente se desconoce por completo el mecanismo de la diferenciación sexual en el género de *Dasyilirion*, teniendo la morfología del órgano floral como único criterio para dicha diferenciación, sin embargo, para ello se tiene que esperar a que la planta llegue a su etapa adulta y a su floración o fructificación. Conocer el sexo de la planta previo a estas dos etapas del ciclo de vida tiene como finalidad llevar a cabo un manejo sustentable de las poblaciones silvestres de *Dasyilirion*. En la actualidad esperar a coincidir con la adultez y floración/fructificación de la planta se ha vuelto un problema que perdura por largos períodos de tiempo debido a que pueden pasar años antes de que en la planta del sotol se repita la floración. Sin embargo, este no es el único problema para la identificación entre plantas de diferente sexo, ya que tampoco se cuenta con diferencias en la composición fisicoquímica, ni en la morfología de la parte vegetativa, así como, tampoco en los valores de diversidad genética, lo cual indica que entre individuos de ambos sexos los efectos de las fuerzas evolutivas (mutación, selección, migración, deriva genética) son similares (Cruz, 2007), lo cual ha hecho más difícil llegar al planteamiento y desarrollo de viveros.

### **1.3. DETERMINACIÓN SEXUAL EN PLANTAS**

Es probable que en muchas especies monoicas y dioicas, la determinación sexual dependa de más de uno de los mecanismos antes mencionados (hormonal, genético o medioambiental) (Khryanin, 2007). Para determinar los factores relacionados con la diferenciación sexual en alguna especie es necesario considerar la existencia de cromosomas homomórficos X y Y (Ming *et al.*, 2007), genes y marcadores moleculares relacionados con la sexualidad; cuantificación de fitohormonas que encaminan la masculinización o feminización de los órganos sexuales de la planta (Durnad y Durnad, 1984; Soldatova y Khryanin, 2010) y el efecto ambiental en la sexualidad de la planta (Heslop y Heslop, 1957; Khryanin, 2002).

Aunque el dioicismo es una característica que se presenta en muchos grupos taxonómicos, poco se conoce sobre la base genética de este evento de reciente evolución (Negrutiu *et al.*, 2001; Vyskot y Hobza, 2004), así como de los factores bioquímicos propios de la planta que participan en que se presente dicho proceso evolutivo. Es por ello que se debe considerar no solo los factores genéticos que tienen influencia en la determinación sexual en la planta, sino también, el papel que tienen las fitohormonas en dicho proceso del desarrollo de la planta. Esto no sólo proporcionará información sobre las funciones de las fitohormonas a niveles molecular y celular, sino también permitirá aplicar los datos obtenidos de las interacciones entre las fitohormonas y toda la planta cuando ocurre un evento imprevisto, ya sea interno o externo (Khryanin, 2002). A la par el conocimiento del efecto del balance de hormonas será útil con propósitos de conservación ya que, modificando en las etapas adecuadas el contenido relativo de cada hormona, pudiera permitir manejar las proporciones de individuos de cada sexo para lograr un mayor éxito reproductivo.

#### **1.4. ESTUDIOS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL**

Hoy en día encontramos estudios organogenéticos que indican que la diferenciación sexual implica al menos tres campos de investigación (Durnad y Durnad, 1984):

1. Identificación de marcadores macromoleculares específicos para estambres o carpelos (programa de expresión).
2. Conocimiento de los cromosomas o genes asociados a la determinación del sexo.
3. Análisis de las señales internas (fitohormonas) que resultan de la inducción del programa de expresión.

##### **1.4.1. Marcadores moleculares**

Aunque en el caso del enfoque molecular aún no se ha identificado con éxito genes de determinación primaria del sexo de cualquier especie dioica, se han generado una serie

de marcadores moleculares ligados al sexo, que han surgido tanto de los programas de mapeo genético o de la investigación orientada a la búsqueda de marcadores ligados al sexo de las especies dioicas agronómicamente importantes (Ainsworth, 2000).

Hay que tener presente que además de las ventajas agronómicas existentes, las técnicas moleculares aportan métodos para la identificación de sexos, que sirven eficientemente como herramienta para la conservación y la gestión de especies amenazadas (Godoy, 2009). Una de las técnicas más empleadas son los marcadores moleculares AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) ya que no es necesario tener la información de la secuencia a evaluar.

Hasta la fecha, los AFLP se ha utilizado en combinación con BSA para identificar marcadores ligados al sexo en varias plantas dioicas, como *Asparagus officinalis* L., *Dioscorea Tokoro*, *Ginkgo biloba*, *Pistacia*, *Ficus fulva*, *Rumex nivalis*, *Cannabis sativa* L., *Rumex acetosa* y *Borjoa patinoi* (Giraldo *et al.*, 2004; Reamon y Jung, 2000; Wang *et al.*, 2001; Parrish *et al.*, 2004; Stehlik y Blattner, 2004; Peil *et al.*, 2003; Golan *et al.*, 2004).

#### **1.4.2. Genes y cromosomas relacionados al sexo**

A diferencia de los animales donde los cromosomas sexuales han evolucionado independientemente hasta presentar formas heteromórficas, solo unas pocas especies vegetales dioicas contiene este tipo de cromosomas heteromórficos (Giraldo *et al.*, 2004), por lo que su identificación sexual mediante genes y cromosomas suele ser más difícil que en animales. Se cree que los cromosomas sexuales han evolucionado a partir de un par autosómico a través de la acumulación de genes determinantes del sexo y la interrupción de la recombinación X-Y que en última instancia condujo a la formación de los cromosomas sexuales heteromórficos (Sola *et al.*, 2012).

En el caso de algunas plantas monoicas, el proceso de determinación sexual se desarrolla y regula por genes determinantes del sexo. Esto se aprecia en el caso de genes mutantes que modifican la expresión sexual, abortando los estambres y cambiando el sexo inicial de flores estaminadas (machos) a flores pistiladas (hembras), y aunque estas

mutaciones tienen poco efecto sobre el desarrollo vegetativo de la planta, afectan específicamente sus caracteres sexuales (Dellaporta y Calderón, 1993).

Un ejemplo de planta dioica heteromórfica se encuentra en las especies de *Silene* (*S. latifolia*), la cual presenta cromosomas  $2n=22$ , XX en hembras y  $2n=22$ , XY en machos (Scutt *et al.*, 1997), cabe señalar que esto es relativamente raro en especies vegetales debido a que las diferencias no son tan pronunciadas como en animales (Khryanin, 2007).

### 1.4.3. Efecto de las fitohormonas en el desarrollo y diferenciación floral

Las hormonas vegetales también conocidas como fitohormonas son reguladores químicos producidos por las mismas plantas, que en bajas concentraciones regulan diversos procesos fisiológicos (estimulando, inhibiendo o modificando el desarrollo) (Weaver, 1996; Vaclav *et al.*, 2009). Se sintetizan en partes u órganos específicos de la planta a concentraciones muy bajas ( $<1$  ppm) y actúan en ese sitio o se traslocan a otro lugar (Liu *et al.*, 2012).

Cada hormona puede suscitar una gran variedad de respuestas en las diferentes células de las plantas, dependiendo de factores como el tipo de célula blanco, la especie, la etapa de desarrollo de la planta, la concentración de la hormona y la presencia de otras hormonas (Audesik *et al.*, 2003).

#### 1.4.3.1. Clasificación y función de las fitohormonas en el desarrollo de las plantas

Para la clasificación de fitohormonas se consideran principalmente cinco grupos: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (**Figura 3**) que representan los grupos de fitohormonas cuyas actividades biológicas son las más estudiadas (**Cuadro 2**) (Audesik *et al.*, 2003).

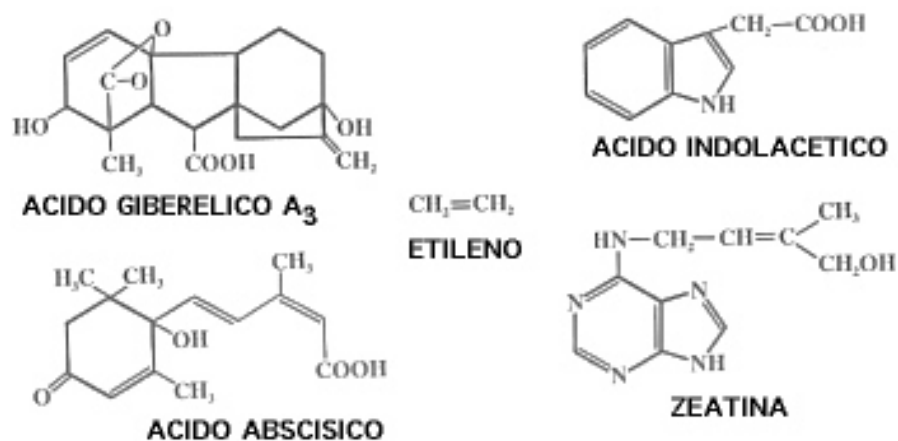
**Auxinas:** Estos compuestos son ácidos de núcleo cíclico insaturado o derivados de estos ácidos (Weaver, 1996) y se producen en los meristemos apicales de brotes y en los ápices de los coleóptilos (Raven *et al.*, 1992).

**Giberelinas:** Son moléculas que pertenecen a la familia de los diterpenoides tetracíclicos cuya estructura básica está constituida por un anillo de *ent*-giberelano (Azcón y Talón, 2008; Yamaguchi, 2008; Santner *et al.*, 2009), las cuales fueron aisladas por primera vez a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, sin embargo, las giberelinas son hormonas naturales reguladoras del crecimiento de muchas plantas (Raven *et al.*, 1992; Tudzynski *et al.*, 1998).

**Citocininas:** Son moléculas químicamente relacionadas con los ácidos nucleicos (Raven *et al.*, 1992). La mayoría de las citocininas exógenas y todas las endógenas derivan de la adenina que posee un sustituyente de naturaleza isoprenoide o aromática posicionado en el nitrógeno amínico 6 del anillo de purina, estas fitohormonas suelen encontrarse en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos (Weaver, 1996; Azcón y Talón, 2008).

**Etileno:** Es un gas regulador natural del crecimiento vegetal (Raven *et al.*, 1992), el cual es considerado como la molécula con actividad reguladora del desarrollo vegetal con la estructura química más simple (Azcón y Talón, 2008).

**Ácido Abscísico:** Es un sesquiterpeno apocarotenoide que se sintetiza en los cloroplastos y otros plastidios (Azcón y Talón, 2008). Esta fitohormona ha demostrado tener efectos opuestos a las hormonas estimuladoras de crecimiento (Raven *et al.*, 1992).



**Figura 3.** Estructura química de las Fitohormonas.

**Cuadro 2.** Funciones Fisiológicas de las Fitohormonas durante las diferentes etapas de desarrollo de una planta.

<b>Fitohormona</b>	<b>Funciones Típicas</b>
<b>Ácido Abscísico (ABA)</b>	Juega un importante papel en la maduración y germinación de semillas, así como, en la adaptación al estrés medioambiental abiótico (Leung y Giraudat, 1998). Por otro lado, promueve el cierre de estomas por una rápida alternancia de los flujos de iones en las células guarda (Azcón y Talón, 2008; Leung y Giraudat, 1998). Mantiene la dormancia en semillas y en particular, la dormancia de invierno (Sadava <i>et al.</i> , 2009). De acuerdo con Xiong y Zhu, (2003), durante el desarrollo de semillas, ABA inicia la maduración del embrión, la síntesis de almacenamiento de reservas y las proteínas de embriogénesis tardía (LEA).
<b>Auxinas</b>	Promueve la elongación del tallo y el crecimiento del fruto (Tewari <i>et al.</i> , 2009; Vaclav <i>et al.</i> , 2009). Induce la elongación de las células de los brotes (Weaver, 1996). Inhibe el crecimiento de las yemas axilares y la abscisión foliar (Sadava <i>et al.</i> , 2009). Regulan la proliferación de raíces y su elongación, tanto como la dominancia apical (Burgos <i>et al.</i> , 2009)
<b>Citocininas</b>	Las citocininas son fitohormonas móviles que desempeñan un papel crítico en el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la regulación de la senescencia de la hoja (Weaver, 1996; Kim et al, 2006), la dominancia apical (Tanaka et al, 2006), la proliferación de la raíz (Werner et al., 2001; Sadava <i>et al.</i> , 2009), filotaxis (Giulini et al., 2004), la competencia reproductiva (Ashikari et al., 2005), y la señalización nutricional (Takei et al., 2002). Dentro de las citocininas bioactivas se encuentran la trans Zeatina (Z) y el ribósido de trans Zeatina (tZR) (Neuberg et al., 2011). Promueve la división celular (Weaver, 1996), la morfogénesis (Vaclav <i>et al.</i> , 2009) y el crecimiento de la yema axilar al reducir la dominancia apical (Azcón y Talón, 2008).
<b>Etileno</b>	Promueve la maduración del fruto (Weaver, 1996) y la abscisión de la hoja (Sadava <i>et al.</i> , 2009). Inhibe la elongación del tallo y el gravitropismo al inducir la formación de raíces laterales, adventicias y pelos radiculares (Azcón y Talón, 2008).
<b>Giberelinas</b>	Dentro de las giberelinas con mayor actividad biológica se encuentran la GA1, GA3, GA4 y GA7, las cuales juegan un papel en diversos procesos del crecimiento de las plantas que incluyen, desarrollo de la semilla, elongación de los órganos, y control del tiempo de la floración (Yamaguchi, 2008; Santner et al., 2009). Promueve la germinación de la semilla, el crecimiento del tallo, así como el desarrollo del fruto (Azcón y Talón, 2008). Regula la división y extensión celular, la inducción de enzimas hidrolíticas durante la germinación de las semillas, inducción floral y producción de frutos (Tudzynski et al., 1998). Interrumpe la dormancia invernal, Moviliza nutrientes de reserva en las semillas de los pastos (Sadava et al., 2009).

#### 1.4.3.2. Control del desarrollo floral y diferenciación sexual por fitohormonas

La diferenciación de los órganos sexuales de las plantas (estambre y pistilo) está influenciada por varios factores ambientales debido a que el medio ambiente a su vez influye en el nivel de las fitohormonas endógenas importantes en la diferenciación sexual, independientemente de los programas genéticos de la planta (Bracale *et al.*, 1991). Un ejemplo de lo anterior es el cambio de sexo mediante la aplicación de hormonas, que indica que en algunas plantas, los genes necesarios para el desarrollo del androceo y gineceo son funcionales en ambos sexos, pero contenidos debido a otros factores.

La acción feminizante y masculinizante de las fitohormonas parece ser dependiente de la especie, esta variación parece ser un reflejo de las diferencias subyacentes en los mecanismos de la determinación sexual (Dellaporta y Calderon, 1993).

El papel de las fitohormonas en la expresión sexual ha sido estudiada en especies tanto monoicas como dioicas (Durand y Durand, 1984), destacándose principalmente la participación de las giberelinas y citocininas en la diferenciación de órganos florales, lo que origina la diferenciación sexual de las plantas. Sin embargo, aparte de las giberelinas y citocininas, hay otras fitohormonas que influyen en el sexo de diferentes especies vegetales.

##### a. Giberelinas (GA's)

Estos compuestos diterpenoides tetracíclicos inducen la formación de elementos florales mediante la actividad de las proteínas DELLA y la regulación del gen FT (Jordán y Casaretto, 2006), mediando de este modo el continuo desarrollo de la flor (Yu *et al.*, 2004). Las giberelinas (Giberelina A3, A4 y A7) han demostrado tener un papel importante en masculinización de diversas plantas, tales como: *Cucumis sativus* (Yin y Quinn, 1995b), *Mercurialis annua* (Boissay *et al.*, 1996), *Zea mays* L. (Zhao *et al.*, 1999), *Buchloe dactyloides* (Yin y Quinn, 1995a) y *Cannabis sativa* L. (Soldatova y Khryanin, 2010). Yu *et al.*, (2004) ha reportado que esta fitohormona induce la formación de elementos florales y adicionalmente pueden afectar la determinación sexual al inducir la



expresión de los genes homeóticos florales AGL20, LEAFY, P1, AP3 y AG involucrados en la regulación de señales inductivas para el desarrollo floral que posiblemente conducen a la modificación de la estructura floral, y por consiguiente, esto influye en la producción de flores masculinas o femeninas. Se ha sugerido, que el gen AGAMOUS (AG) tiene la función de la especificación de la identidad temprana del estambre y carpelo.

## **b. Citocininas**

Aunque algunas citocininas (trans Zeatina, tZ) participan principalmente en la feminización de las plantas, existen variantes del grupo de las citocininas (ribósido de trans-Zeatina, tZR) que producen el efecto contrario (Louis *et al.*, 1990). Se ha observado que en *Mercurialis annua* el ribósido de trans-Zeatina produce la masculinización de las flores (Louis *et al.*, 1990; Soldatova y Khryanin, 2010). Dentro de las plantas en las que las citocininas producen un efecto feminizante encontramos a: *Cucumis sativus* (Yin y Quinn, 1995b), *Mercurialis annua* (Boissay *et al.*, 1996), *Zea mays* L. (Zhao *et al.*, 1999), *Buchloe dactyloides* (Yin y Quinn, 1995a), *Vitis* sp (Negi y Olmo, 1966), *Spinacia* sp., (Chailakhyan y Khryanin, 1978) y *Cannabis sativa* L. (Galoch, 1978; Soldatova y Khryanin, 2010).

Es importante destacar que la diferenciación sexual en las plantas no siempre es inducida por las giberelinas y citocininas. Un ejemplo claro de esto, es *Asparagus officinalis* especie que pertenece a la misma familia que *Dasyllirion cedrosanum*, en la cual la determinación sexual entre plantas hembra y macho depende de los niveles endógenos de auxina y citocinina, respectivamente (Bracale *et al.*, 1991). Dentro de las fitohormonas que juegan un papel importante en la diferenciación sexual en otras especies de plantas encontramos a las auxinas, el ácido abscísico y el etileno (Kumar *et al.*, 2009). Las interacciones entre fitohormonas, en un posible contexto de balance hormonal, constituyen un factor importante de la condición sexual de las plantas (Soldatova y Khryanin, 2010).

### **c. Auxinas**

Las auxinas son fitohormonas relacionadas con la masculinización en algunas plantas, entre ellas las pertenecientes a *Mercurialis annua*. En plantas machos de esta especie se han encontrado altos niveles de auxinas (ácido 3-indolacético, AIA) y se ha establecido la existencia de una fuerte correlación de los niveles de auxina y el genotipo de plantas macho (Hamdi *et al.*, 1987).

Estudios anteriores en individuos de esta misma especie sugieren que los genes establecen individuos como machos o hembras, y que se puede controlar la expresión sexual mediante el establecimiento de los niveles endógenos de auxinas y citocininas. La aplicación exógena de auxina induce la masculinización de flores en plantas hembra de *M. annua* (Hamdi *et al.*, 1987). En el caso de *Cannabis sativa* altos niveles de ácido abscísico inducen la feminización de las flores de la planta (Galoch, 1978).

### **d. Ácido Abscísico (ABA)**

El ácido abscísico no actúa de forma aislada, esta hormona tiene participación en varios procesos como antagonista de otras fitohormonas relacionadas con la diferenciación de los órganos sexuales (Galoch, 1978). En *Cannabis sativa* el ácido abscísico participa como antagonista de la giberelina A3 y el ácido indolacético solo cuando el ABA es aplicado junto con alguna de estas dos hormonas (Ejemplo: mezcla ABA-GA3 y/o mezcla ABA-AIA) inductores de la masculinización y feminización, respectivamente (Galoch, 1978). Por ejemplo, se ha propuesto que las concentraciones opuestas entre ácido abscísico y ácido indolacético aceleran el desarrollo floral en *Solidaster luteus* (Flórez y Alexio, 2009).

### **e. Etileno**

El etileno es un regulador con funcionamiento hormonal que ha demostrado desempeñar un papel muy importante en la determinación del sexo de las flores en las plantas monoicas. En cucurbitáceas los niveles altos de giberelinas se asocian a la

masculinización, pero un tratamiento con etileno cambia la expresión sexual a favor de la feminización de la flor (Papadopoulou y Grumet, 2005). En el pepino (*Cucumis sativus*) se encontró que las yemas florales femeninas contenían más etileno que las yemas florales masculinas. Además, los pepinos que estaban en condiciones lumínicas de día corto, que provoca feminización, liberaban mucho más etileno que los que estaban en condiciones de día largo (Norato y Espejo, 1985). Por otro lado, se ha comprobado experimentalmente que el etileno promueve feminización en plantas de calabazas (*Cucurbita pepo*), sin embargo, tiene un efecto contrario al inducir la masculinización en otras plantas, como es el caso de la sandía (*Citrullus lanatus*) (Rudich, 1990). En otros estudios se ha demostrado que el etileno es capaz de controlar el aborto del desarrollo de estambres en melón y pepino por medio de *CmACS7* y *CsACS2*, dos genes que se expresan específicamente en los carpelos de las flores femeninas (Martínez, 2013). Lo anterior demuestra que en las cucurbitáceas el etileno está fuertemente relacionado con la regulación de la expresión sexual (Raven *et al.*, 1992).

### **1.5. FACTORES EXTERNOS EN LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN PLANTAS**

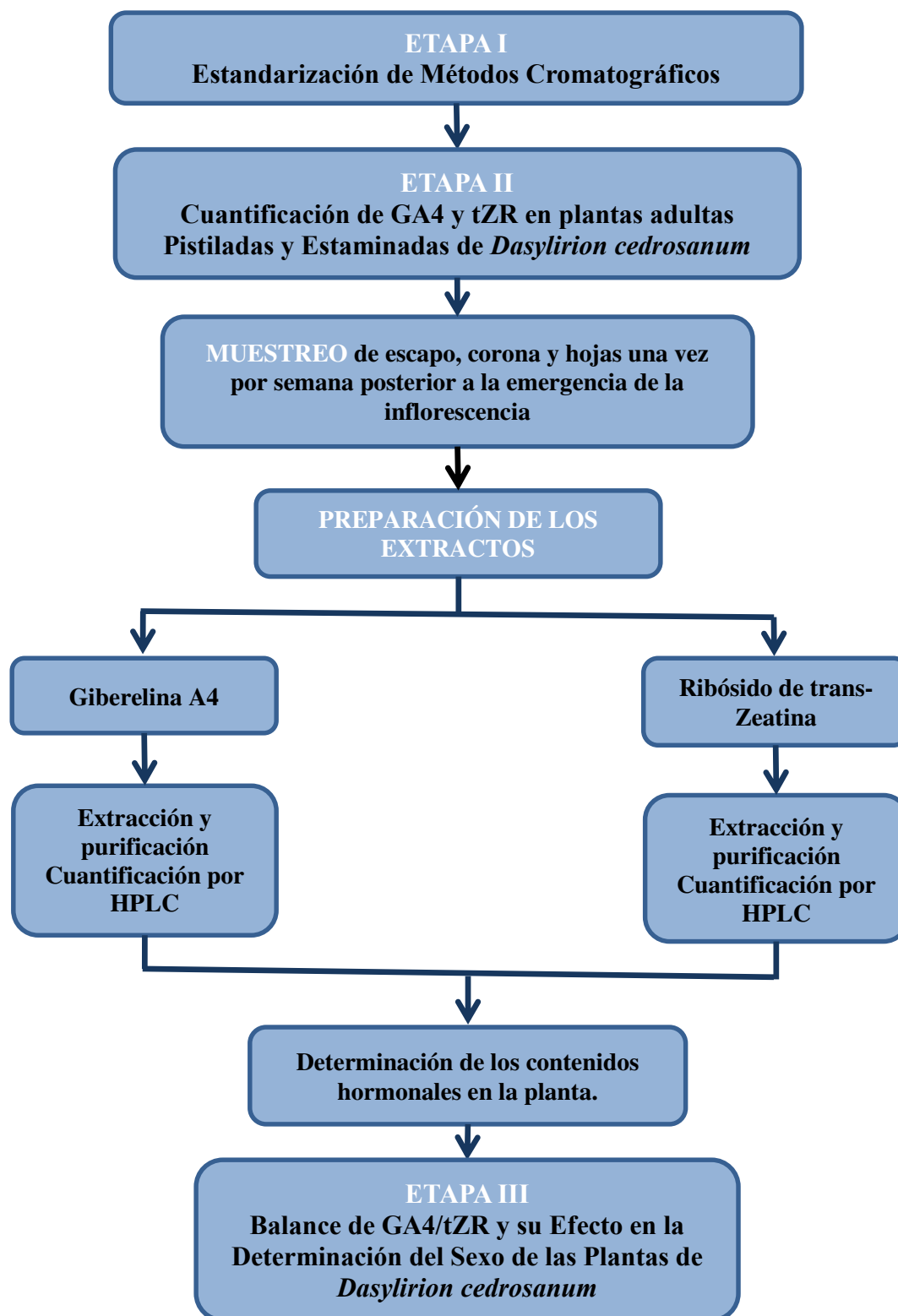
Existen por otra parte factores externos e internos que, a través de su efecto en los procesos bioquímicos y fisiológicos, con impacto en las señales internas capaces de modificar programas de expresión como los que determinan el sexo de la planta (Yamasaki *et al.*, 2005). En ese sentido, según lo descrito por Khryanin (2002) todos los agentes que inducen la producción de raíces y la síntesis de citocininas (día corto, radiación con sesgo al azul, más CO, un alto nivel de nitrógeno, una humedad alta y temperaturas bajas) promueven la sexualización femenina (Heslop y Heslop, 1957). Por el contrario, los factores que estimulan el crecimiento de brotes y la síntesis de giberelinas (día largo, radiación con sesgo al rojo, menos CO, un alto nivel de potasio, temperaturas altas y una humedad baja) promueven la sexualización masculina.

Por otro lado, la nutrición mineral en la planta también influye en la concentración de las giberelinas y citocininas, lo cual se ve reflejado en el efecto sobre la masculinización y feminización en la planta, algo similar ha sido reportado para *Cannabis sativa*. Las

semillas de *Cannabis sativa* germinadas en un medio enriquecido con  $\text{Pb}(\text{NO}_3)$  tienen un incremento en los niveles endógenos de giberelinas y un aumento en la aparición de las plantas estaminadas. Por contraste, de acuerdo con Soldatova y Khryanin, (2010), las plantas obtenidas a partir de semillas germinadas en medio suplementado con  $\text{CuSO}_4$  and  $\text{ZnSO}_4$  mostraron un incremento de los niveles de zeatina, lo que dio como resultado un incremento en la frecuencia de las plantas pistiladas. El trabajo de Soldatova y Khryanin (2010), indica un efecto de ciertos minerales sobre la producción de una determinada fitohormona, y el efecto que tiene el incremento de hormonas específicas sobre el desarrollo de flores masculinas o femeninas.

Debido a que las Giberelinas (Giberelina A3, A4 y A7) y las Citocininas (trans Zeatina y ribósido de trans Zeatina) ha sido ampliamente reportada como responsables de la masculinización y feminización en diversas plantas, se determinó llevar a cabo la cuantificación de dos fitohormonas en tejidos de hoja, corona e inflorescencia de *Dasylirion cedrosanum*. La selección de las fitohormonas a evaluar se llevó a cabo en base a los reportes de literatura, la Giberelina A4 (GA4) fue seleccionada debido a que tiene potencial para incrementar la producción de plantas estaminadas, mientras el precursor de la trans Zeatina (tZ) (fitohormona relacionada con genes responsables de la feminización en *Mercurialis annua*) conocido como ribósido de trans-Zeatina (tZR) fue seleccionado por ser identificado como un inductor de la masculinización en la misma especie (Louis *et al.*, 1990).

## 2. MATERIALES y MÉTODOS



**Figura 4.** Esquema General de las Etapas Metodológicas.

## ETAPA I. Selección de la técnica de extracción y estandarización de los métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de GA4 y tZR

### 2.1. Estandarización de la técnica de extracción para GA4 y tZR

La mezcla de solventes y la técnica de extracción para giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina fueron seleccionadas y estandarizadas tomando como base diferentes metodologías reportadas (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Técnicas reportadas en literatura para la extracción de giberelinas y citocininas.

Referencia	Giberelina A4	Referencia	Ribósido de trans-zeatina
	Método de la Literatura		Método de la Literatura
<b>Gupta <i>et al.</i>, 2011 (GA3)</b>	Metanol : Agua : Ácido Fórmico (75:20:5)	<b>Shindy y Smith, 1975 (Citocininas)</b>	<b>Extracción:</b> Metanol frío al 80% <b>Alcalinizar:</b> NaOH al 1% a pH 8.6 <b>Disolver:</b> 80% Metanol <b>Evaporar</b> el metanol <b>Mezclar</b> Fase acuosa con NaOH al 1% a pH 5.5 <b>Particionar:</b> Agua saturada con butanol
<b>Soldatova y Khryanin, 2010 (GA3)</b>	<b>Extracción:</b> 80% Etanol <b>Acidificación:</b> HCl 1N (pH 3.0) <b>Alcalinización:</b> NaOH 1 N (pH 9.0)	<b>Soldatova y Khryanin, 2010 (Citocininas)</b>	Agua saturada con Butanol
<b>Hou <i>et al.</i>, 2008 (GA3)</b>	MeOH : Agua : Ácido Fórmico (20:80:0.1)	<b>Giannarelli <i>et al.</i>, 2010 (Citocininas)</b>	Metanol : Agua : Ácido Fórmico (75:20:5)

### 2.1.1. Estandarización de la metodología cromatográfica para la cuantificación de GA4 y tZR

La estandarización de la metodología para la cuantificación de giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina se llevó a cabo tomando como referencia las metodologías reportadas por varios autores (**Cuadro 4**). Para lo cual se realizaron pruebas con valores más altos, iguales y más bajos a los valores de velocidad de flujo, longitud de onda, y proporciones de fases reportados en la literatura (**Cuadro 5**).

**Cuadro 4.** Métodos cromatográficos reportados en literatura para cuantificar giberelinas y citocininas.

Parámetros	Método 1	Método 2	Método 3
<b>Fase A</b>	100% de Metanol	100% de Acetonitrilo	18% de Acetonitrilo en Buffer de Fosfato
<b>Fase B</b>	Ácido Acético al 0.6%	Agua pH 4.98	
<b>Proporción (A:B)</b>	60:40	12:88	Isocrático
<b>Flujo (mL/min)</b>	1.0 mL/min	2.0 mL/min	0.08 mL/min
<b>Longitud de onda</b>	265 nm	265 nm	204 nm (GA3)
			210 nm (Zeatina)
<b>Columna</b>	Luna-C18 (Phenomenex) (4.6x150 mm, 5 µm ID)	Bondapak C18 (Waters) -----	Millichrom-5 SeparonC18 (80 x 2mm, 5 µm ID)
<b>Tiempo de Retención</b>	2.75 min (GA3)	2.85 min (GA3)	-----
		3.88 min (Zeatina)	
<b>Lámpara</b>	UV	UV	UV
<b>Equipo LC</b>	-----	Thermo Scientific, Spectra System	-----
<b>Referencia</b>	Gupta <i>et al.</i> , 2011	Atici <i>et al.</i> , 2005	Soldatova y Khryanin, 2010

**Cuadro 5.** Valores bajos y altos evaluados en los parámetros cromatográficos.

Parámetro	Valor más bajo	Valor más alto
Velocidad de Flujo	0.1 mL/min	2.0 mL/min
Longitud de Onda	200 nm	270 nm
Proporciones de Fases	Fase A:B (10:90)	Fase A:B (90:10)
pH	3.0	5.0

## **ETAPA II. Cuantificación de GA4 y tZR en plantas adultas de *Dasyllirion cedrosanum***

### **2.2. Descripción de las localidades de muestreo**

#### ***El Cañón de San Lorenzo, Saltillo, Coahuila, México (Sierra de Zapaliname).***

Localizada a 25°20'22'' latitud Norte y 100°59'23'' longitud Oeste a una altura de 1942 ± 10 msnm. El clima predominante en la región es seco, en las partes altas el clima es templado. Se registra una temperatura media anual de 16.9° C y la precipitación media anual de 498 mm (INIFAP, Registros del Clima del año 2014). El suelo es franco arcilloso, calcáreo, con pH= 8.3 ± 0.1 y con un contenido moderadamente alto de materia orgánica. Los suelos no son salinos y tienen una conductividad eléctrica de 0.134 ± 0.020 mmhos/cm.

#### ***Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.***

Esta localidad se encuentra en las coordenadas 25°20'58.0" latitud Norte y 101°01'41.7'' longitud Oeste a una altura de 1842 ± 10 msnm. El clima de Saltillo es templado, semiseco con pocas lluvias en verano e invierno, con una temperatura promedio de 17°C, con una precipitación media anual de 369.3mm (INIFAP, Registros del Clima del año 2014). El suelo es franco, calcáreo, con pH= 8.3 ± 0.1 y un contenido moderadamente bajo de materia orgánica. Los suelos no son salinos y tienen una conductividad eléctrica de 0.218 ± 0.031 mmhos/cm.



**General Cepeda, Coahuila, México.** Esta región se encuentra en las coordenadas 25°22'35" latitud Norte, 101°28'30" longitud Oeste, a una altura de 1986 ± 15.63 msnm. El municipio en el año 2013 esta localidad tuvo una precipitación media anual de 414.6 mm, una temperatura media anual de 18.42°C y una humedad relativa media anual de 53.07% (INIFAP, Registros del Clima del año 2014). Su clima es semiárido (BSH) según la clasificación de Köppen. El suelo es franco limoso, calcáreo, con pH= 8.3 ± 0.1 y un contenido moderadamente alto de materia orgánica. Los suelos no son salinos y tienen una conductividad eléctrica de 0.173 ± 0.004 mmhos/cm.

### 2.2.1. Geoposicionamiento de plantas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum*

Se llevó a cabo la búsqueda de plantas con inflorescencias viejas que pudieran dar a conocer el sexo de éstas, y fueron etiquetadas y geoposicionadas para el posterior muestreo de individuos que presentaran emergencia de la inflorescencia. Las plantas fueron etiquetadas con los siguientes datos: coordenadas, altura, número de planta, sexo y localidad.

Las plantas a muestrear en las tres localidades del Estado de Coahuila fueron geoposicionadas con el objetivo de llevar a cabo los muestreos en los mismos individuos durante todo el desarrollo de la inflorescencia. Para ellos se consideró las coordenadas y la altura del lugar donde se encontraron las plantas de cada una de las localidades: Cañón de San Lorenzo (**Cuadro 6**), Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) (**Cuadro 7**), General Cepeda (**Cuadro 8**).

**Cuadro 6.** Coordenadas de las plantas muestreadas en la localidad del Cañón de San Lorenzo.

CAÑÓN DE SAN LORENZO				
CLAVE	SEXO	COORDENADAS		ALTURA (msnm)
		N	O	
LF1	H	25°20'14"	100°59'23"	1919
LF2	H	25°20'13"	100°59'23"	1942
LF3	H	25°20'22"	100°59'27"	1945
LF4	H	25°20'17"	100°59'24"	1951
LF5	M	25°20'13"	100°59'22"	1935
LF6	M	25°20'15"	100°59'17"	1948
LF7	M	25°20'22"	100°59'27"	1945
LF8	M	25°20'19"	100°59'28"	1958

**Cuadro 7.** Coordenadas de las plantas muestreadas en la localidad de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO				
CLAVE	SEXO	COORDENADAS		ALTURA (msnm)
		N	O	
N1	H	25°20'55.0"	101°01'42.7"	1797
N2	H	25°20'58.0"	101°01'41.7"	1790
N3	H	25°20'57.5"	101°01'41.0"	1803
N4	M	25°20'55.0"	101°01'42.7"	1797
N5	M	25°20'57.9"	101°01'41.7"	1791
N6	M	25°20'56.9"	101°01'42.4"	1798

**Cuadro 8.** Coordenadas de las plantas muestreadas en la localidad de General Cepeda.

GENERAL CEPEDA				
CLAVE	SEXO	COORDENADAS		ALTURA (msnm)
		N	O	
G1	H	25°18'45.0"	101°45'28.7"	1966
G2	H	25°18'44.4"	101°45'27.3"	1970
G3	H	25°18'41.9"	101°45'29.7"	1980
G4	H	25°18'43.0"	101°45'29.6"	1971
G5	M	25°18'43.5"	101°45'26.5"	1976
G6	M	25°18'39.6"	101°45'25.8"	1987
G7	M	25°18'39.6"	101°45'25.7"	1990
G8	M	25°18'37.3"	101°45'27.6"	2017

### 2.2.2. Diseño de muestreo y colecta de tejidos vegetales

La evaluación de los niveles de giberelina A4 (GA4) y ribósido de trans-zeatina (tZR) se realizó en tejido de hoja, corona e inflorescencia de plantas adultas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum* localizadas en tres zonas ecológicas distintas: Cañón de San Lorenzo y Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ambas localizadas en el municipio de Saltillo, Coahuila, México y en la región de General Cepeda, Coahuila.

El muestreo de corona, hojas e inflorescencia se llevó a cabo bajo un esquema de muestreo dirigido en donde las plantas a seleccionar cumplieron con la característica de poseer una inflorescencia de reciente emergencia. El muestreo de estos órganos se realizó en cuatro plantas con flores pistiladas (femeninas) y cuatro plantas con flores estaminadas (macho), mismas que fueron muestreadas repetidamente una vez por semana desde el

inicio de la aparición de la inflorescencia hasta que éste se secó completamente. Los muestreos 1, 2, 3 y 4 hacen referencia a diferentes etapas del desarrollo de la inflorescencia: Etapa 1 (emergencia de la inflorescencia), Etapa 2 (aparición de las flores), Etapa 3 (aparición del polen y/o semillas), y Etapa 4 (muerte de la inflorescencia), respectivamente.

Para minimizar el daño en la planta, las muestras de tejido fueron obtenidas con ayuda de un sacabocados que colectaba de 2 a 5 gramos de tejido fresco de la corona y la inflorescencia, teniendo cuidado de que la muestra no sobrepasara más de una tercera parte del diámetro de la inflorescencia. En el caso de las hojas, con ayuda de una navaja fueron cortadas desde la base dos de las hojas más jóvenes con desarrollo completo que estuvieran cercanas al sitio de la emergencia de la inflorescencia, las cuales fueron cortadas en trozos de 2 cm.

### **2.2.3. Almacenamiento de las muestras**

Cada muestra obtenida fue colocada en un recipiente de plástico previamente etiquetado que inmediatamente fue sumergida en nitrógeno líquido, en donde permaneció hasta ser almacenado en un Ultracongelador (SANYO modelo MDF-U53VA) a -80 °C. Posterior a 12 horas de congelación a cada una de las muestras se les eliminó por completo el agua mediante un liofilizador (LABCONCO Modelo 2.5L) con un vacío de 0.25 mBar y una temperatura de -40 °C. Finalmente, las muestras fueron pulverizadas en un mortero y almacenadas a temperatura ambiente en recipientes que contenían silica gel y con sellado hermético.

### **2.2.4. Extracción de Giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina**

La extracción de ambas fitohormonas fue hecha como lo describió Hou *et al.* (2008), con ligeras modificaciones de la solución de Bielecki, la cual ha sido ampliamente usada para la extracción de citocininas y giberelinas (Dobrev y Kamínek, 2002).

Se pesaron 50 mg de cada muestra dentro de un microtubo para centrifuga y se añadió 1mL de la solución de extracción (Metanol al 20% (v/v) diluido en ácido fórmico

al 0.1%(v/v)). La mezcla se sometió al vortex (GENIE 1 Tocuh Mixer Modelo SI-0136) por 30 segundos y a sonicación (BRANSON Modelo 1510R-DTH) por 10 min. Después las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C y trasladadas a un congelador de -20 °C para dejarse incubando durante 12 h. Trascurrido este tiempo las muestras volvieron a sonicarse por 10 min, y se centrifugaron por segunda vez a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C.

Finalmente, el sobrenadante obtenido fue filtrado mediante membranas de PVDF de 0.45 µm de diámetro de poro, el sobrenadante filtrado fue transferido a viales para automuestreador para su posterior inyección en el cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones cromatográficas específicas para cada fitohormona.

#### **2.2.5. Determinación de Giberelina A4 por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)**

El procedimiento para la identificación y cuantificación de GA4 fue modificado a partir de la metodología original descrita por Atici *et al.* (2005) y Soldatova y Khryanin, (2010).

La determinación de GA4 se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (VARIAN Modelo 920LC) con detector UV. La separación e identificación de la GA4 se realizó mediante una columna POLARIS 5 C18-A de 250 mm de largo por 4.5 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula (Marca VARIAN) a temperatura ambiente. Las fases móviles fueron compuestas de ácido acético 100 mM y acetonitrilo al 100% en una proporción 50:50 (v/v) en modo isocrático a un flujo de 0.8 mL/min. El volumen de inyección del extracto vegetal fue de 50 µL. La detección de la molécula fue monitoreada a 205 nm.

Para la cuantificación de los niveles hormonales se realizó una curva patrón a diferentes concentraciones de un estándar de GA4 con 90.0% de pureza (SIGMA). El tiempo de retención de la GA4 fue de 7.8±0.2 min. Los resultados de los cromatogramas obtenidos fueron evaluados mediante el software Galaxie Versión 1.9.302.530 (VARIAN).

### **2.2.6. Determinación de ribósido de trans-zeatina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)**

El procedimiento para la identificación y cuantificación de tZR fue modificado a partir de la metodología original descrita por Atici *et al.*, 2005 y Soldatova y Khryanin, 2010.

La determinación de tZR se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (VARIAN Modelo 920LC) con detector UV. La separación e identificación de la tZR se realizó mediante una columna AQUASIL C18 de 250 mm x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5  $\mu$ m (THERMO SCIENTIFIC) a temperatura ambiente. Las fases móviles fueron compuestas de ácido acético 100 mM y acetonitrilo al 100% en una proporción 80:20 (v/v) en modo isocrático a un flujo de 0.3 mL/min. El volumen de inyección del extracto vegetal fue de 50  $\mu$ L. La detección de la molécula fue monitoreada a 268 nm.

Para la cuantificación de los niveles hormonales se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de un estándar de tZR con 95.0% de pureza (SIGMA). El tiempo de retención de la tZR es  $15.4 \pm 0.25$  min. Los resultados de los cromatogramas obtenidos fueron evaluados mediante el software Galaxie Versión 1.9.302.530 (VARIAN).

### **ETAPA III. Balance de GA4/tZR y su efecto en la determinación del sexo en plantas adultas de *Dasyllirion cedrosanum***

#### **2.3. Estimación del balance GA4/tZR**

El balance GA4/tZR fue calculado a partir del cociente de las concentraciones de giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina cuantificadas en un mismo órgano de una planta colectada durante el mismo muestreo.

Por medio de análisis estadísticos (ANOVA y DMS) se correlacionó el contenido de las fitohormonas con la determinación del sexo en plantas adultas de *Dasyllirion cedrosanum* Trel. A la par, se verificó el órgano, la localidad y la etapa con mayor

contenido de cada una de las fitohormonas y mayor valor del balance resultante del cociente entre GA4/tZR.

## **2.4. Diseño Experimental**

Para el análisis de resultados se utilizó un diseño experimental de medias repetidas. Las variables independientes fueron: el sexo (Pistiladas y Estaminadas), los órganos (Hoja, Inflorescencia y Corona), las localidades (Cañón de San Lorenzo, General Cepeda y UAAAN) y las fechas de desarrollo de la inflorescencia (Etapa 1, 2, 3 y 4). Por otro lado, las variables dependientes fueron: las concentraciones de GA4 y tZR, así como el balance de GA4/tZR. En el análisis se tuvieron 4 repeticiones para cada variable evaluada.

## **2.5. Análisis Estadístico**

Los datos de GA4 y tZR, así como, los del balance de fitohormonas (GA4/tZR) fueron sometidos a un MANOVA con mediciones repetidas (Prueba de Lambda de Wilks,  $p \leq 0.05$ ) para comparar si hay diferencia significativa en la concentración de las fitohormonas en las diferentes variables evaluadas. Posteriormente, se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación de las medias que mostraron una significancia estadística en el ANOVA. El software estadístico usado fue el Statistica versión 7.0.

### 3. RESULTADOS

#### ETAPA I. Selección de la técnica de extracción y estandarización de los métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de GA4 y tZR

##### 3.1. Estandarización de la técnica de extracción para GA4 y tZR

El **Cuadro 9** muestra las técnicas reportadas en la literatura por diversos autores para la extracción de giberelinas y citocininas. Cada una de éstas fueron probadas para la extracción de GA4 y tZR en diferentes tejidos de la planta de *Dasyllirion cedrosanum*. La selección de la técnica de extracción para GA4 y tZR se llevó a cabo tomando en cuenta la metodología que proporcionó un pico mejor definido y con mayor sensibilidad a la detección de las fitohormonas, siendo la técnica elegida para ambas fitohormonas la reportada por Hou *et al.* (2008).

**Cuadro 9.** Estandarización de la técnica para la extracción de fitohormonas.

Referencia	Giberelina A4		Referencia	Ribósido de trans-zeatina	
	Método de la Literatura	Método Seleccionado		Método de la Literatura	Método Seleccionado
<b>Gupta <i>et al.</i>, 2011 (GA3)</b>	Metanol: Agua: Ácido Fórmico (75:20:5)	Metanol al 20% diluido en ácido fórmico al 0.1%	<b>Shindy y Smith, 1975 (Citocininas)</b>	<b>Extracción:</b> Metanol frío al 80% <b>Alcalinizar:</b> NaOH al 1% a pH 8.6 <b>Disolver:</b> 80% Metanol <b>Evaporar</b> el metanol <b>Mezclar</b> Fase acuosa con NaOH al 1% a pH 5.5 <b>Particionar:</b> Agua saturada con butanol	Metanol al 20% diluido en ácido fórmico al 0.1%
<b>Soldatova y Khryanin, 2010 (GA3)</b>	<b>Extracción:</b> 80% Etanol <b>Acidificación:</b> HCl 1N a pH 3.0 <b>Alcalinización:</b> NaOH 1 N a pH 9.0		<b>Soldatova y Khryanin, 2010 (Citocininas)</b>	Agua saturada con Butanol	
<b>Hou <i>et al.</i>, 2008 (GA3)</b>	MeOH:Agua: Ácido Fórmico (20:80:0.1)		<b>Giannarelli <i>et al.</i>, 2010 (Citocininas)</b>	Metanol:Agua:Ácido Fórmico (75:20:5)	

### 3.2. Estandarización de la metodología cromatográfica para la cuantificación de GA4 y tZR

El **Cuadro 10** muestra las metodologías cromatográfica para la determinación de GA4 y tZR.

Los valores con los que se inició la optimización del método fueron los valores reportados en cada uno de los métodos de la literatura (**Cuadro 4**). Los métodos estandarizados obtenidos tienen características de 2 de las metodologías evaluadas (Atici *et al.*, 2005; Soldatova y Khryanin, 2010).

**Cuadro 10.** Estandarización de metodología para cuantificación de fitohormonas por HPLC.

Parámetros	Metodologías Estandarizadas	
	GA4	tZR
Fase A	Acetonitrilo 100%	Acetonitrilo 100%
Fase B	Ácido acético 100 mM en Agua (pH 4.98)	Ácido acético 100 mM en Agua (pH 4.98)
Proporción A:B	50:50	80:20
Flujo (mL/min)	0.8 mL/min	0.3 mL/min
Longitud de onda	205nm	268nm
Columna	C18 Hypersil GOLD (100 x 4.6mm, 5µm ID).	Aquasil C18 (250 mm x 4.6, 5 µm)
Tiempo de Retención	7.8±0.2 min	15.4±0.25 min
Lámpara	UV	UV
Equipo LC	Varian 920LC	Varian 920LC

### ETAPA II. Cuantificación de GA4 y tZR en plantas adultas de *Dasyllirion cedrosanum*

Para evaluar el efecto de las variables independientes sobre las concentraciones de GA4 y tZR obtenidas se realizó un análisis multivariado (MANOVA), el cual indicó



diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el contenido de GA4 (**Cuadros 11**) entre sexo, órganos, localidades e interacciones.

**Cuadro 11.** MANOVA correspondiente a la evaluación de GA4 (Prueba de  $\lambda$  de Wilks).

FACTOR	Valor ( $\lambda$ de Wilks)	F	Efecto de gl	Error de gl	p
Sexo (S)	0.76	3.63	4	45.00	0.012*
Órgano (O)	0.41	6.33	8	90.00	0.000*
Localidad (L)	0.40	6.52	8	90.00	0.000*
Sexo x Órgano x Localidad (S x O x L)	0.46	2.49	16	138.11	0.002*

gl= Grados de Libertad, p= probabilidad ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3. Concentraciones de GA4 en órganos de plantas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum*

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) que se presentan en el **Cuadro 12**, las diferencias de GA4 se encontraron en plantas de diferente sexo durante las etapas 2 y 3 después de la emergencia de la inflorescencia.

La cuantificación de GA4 en los diferentes órganos mostró que durante las etapas 1 y 2 los niveles más altos de esta fitohormona se encontraron en las hojas, mientras en las etapas 3 y 4, no hubo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre niveles de GA4 presentes en los tejidos de la corona y las hojas.

Las plantas de la localidad de la UAAAN presentaron los niveles más altos de GA4 durante las dos primeras etapas de muestreo, mientras en las etapas 3 y 4, la localidad de la UAAAN junto con la del Cañón de San Lorenzo, fueron las localidades con mayor contenido de la fitohormona. Es importante mencionar que estas dos localidades se encuentran en el municipio de Saltillo, Coahuila. Los niveles más bajos de GA4 se encontraron en las plantas colectadas en la localidad de General Cepeda.

**Cuadro 12.** Media y Error Estándar de la concentración de GA4 (mg/g de peso seco) en plantas de *Dasyllirion cedrosanum*.

FACTOR	ETAPAS DE DESARROLLO			
	1	2	3	4
<b>Sexo</b>				
P	0.0904 ± 0.02 <b>a</b>	0.1068 ± 0.02 <b>b</b>	0.1559 ± 0.03 <b>b</b>	0.2478 ± 0.05 <b>a</b>
E	0.1099 ± 0.02 <b>a</b>	0.1944 ± 0.05 <b>a</b>	0.3371 ± 0.08 <b>a</b>	0.2323 ± 0.09 <b>a</b>
<b>Órgano</b>				
I	0.0580 ± 0.01 <b>b</b>	0.1066 ± 0.03 <b>b</b>	0.0684 ± 0.01 <b>b</b>	0.1673 ± 0.05 <b>a</b>
C	0.0747 ± 0.02 <b>b</b>	0.0918 ± 0.02 <b>b</b>	0.3090 ± 0.11 <b>a</b>	0.3335 ± 0.14 <b>a</b>
H	0.1678 ± 0.04 <b>a</b>	0.2534 ± 0.06 <b>a</b>	0.3621 ± 0.07 <b>a</b>	0.2193 ± 0.04 <b>a</b>
<b>Localidad</b>				
GC	0.0492 ± 0.02 <b>b</b>	0.0878 ± 0.03 <b>b</b>	0.0889 ± 0.02 <b>b</b>	0.0760 ± 0.03 <b>b</b>
CSL	0.0995 ± 0.02 <b>b</b>	0.1090 ± 0.01 <b>b</b>	0.3141 ± 0.10 <b>a</b>	0.3839 ± 0.13 <b>a</b>
UAAAN	0.1690 ± 0.04 <b>a</b>	0.2898 ± 0.08 <b>a</b>	0.3665 ± 0.09 <b>a</b>	0.2669 ± 0.07 <b>ab</b>

Los datos representan los valores medios ± error estándar. Letras diferentes en columnas corresponden a diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) dentro de un mismo factor dentro de una misma etapa del desarrollo de la inflorescencia de acuerdo a la Prueba de DMS de Fisher. (P) Pistilada, (E) Estaminada, (I) Inflorescencia, (C) Corona, (H) Hoja, (GC) General Cepeda, (CSL) Cañón de San Lorenzo, (UAAAN) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### 3.4. Concentraciones de tZR en órganos de plantas pistiladas y estaminadas *D. cedrosanum*

El MANOVA realizado para evaluar el efecto de las variables independientes sobre la concentración de tZR (**Cuadro 13**) indica que no había diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre plantas de diferente sexo y localidad.

**Cuadro 13.** MANOVA correspondiente a la evaluación de tZR (Prueba de  $\lambda$  de Wilks).

FACTOR	Valor ( $\lambda$ de Wilks)	F	Efecto de gl	Error de gl	P
Sexo (S)	0.91	1.0921	4	45.00	0.372
Órgano (O)	0.57	3.6758	8	90.00	0.001*
Localidad (L)	0.60	3.3282	8	90.00	0.002*
Sexo x Órgano x Localidad (S x O x L)	0.69	1.0983	16	138.11	0.362

gl= Grados de Libertad, p= probabilidad ( $p \leq 0.05$ ).

Mientras los resultados obtenidos en la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) que se muestran en el **Cuadro 14**, indican que el contenido de tZR varía entre órganos durante la primera semana de la emergencia de la inflorescencia. Se mostró una notable diferencia en los niveles de tZR donde estos fueron mayor en la Corona en comparación al contenido en Hojas e Inflorescencia. Dicha diferencia desaparece durante las etapas 2 y 3 del desarrollo de la inflorescencia, y reaparece durante la etapa 4 en la cual los niveles de tZR fueron en Corona iguales a los valores de la Inflorescencia, mientras la Inflorescencia presentó valores mayores a los de las Hojas.

Este patrón podría estar relacionado con la señalización asociada con la inducción de la floración, sin observarse diferencias en los niveles de tZR atribuibles al sexo.

Las diferencias en la concentración de tZR entre localidades fueron solo apreciadas durante la etapa 1, con un contenido más alto de esta hormona en las plantas procedentes de General Cepeda y UAAAN, que en las plantas colectadas en el CSL.

**Cuadro 14.** Media y Error Estándar de la concentración de tZR (mg/g de peso seco) en plantas de *Dasyllirion cedrosanum*.

FACTOR	ETAPA			
	1	2	3	4
<b>Sexo</b>				
P	0.0513 ± 0.01 a	0.0703 ± 0.01 a	0.0636 ± 0.01 a	0.0840 ± 0.01 a
E	0.0624 ± 0.01 a	0.0734 ± 0.01 a	0.0733 ± 0.01 a	0.0842 ± 0.01 a
<b>Órgano</b>				
I	0.0398 ± 0.01 c	0.0743 ± 0.01 a	0.0647 ± 0.01 a	0.0822 ± 0.01 ab
C	0.0723 ± 0.01 a	0.0749 ± 0.01 a	0.0682 ± 0.01 a	0.0984 ± 0.01 a
H	0.0583 ± 0.01 b	0.0664 ± 0.01 a	0.0726 ± 0.01 a	0.0717 ± 0.01 b
<b>Localidad</b>				
GC	0.0695 ± 0.01 a	0.0758 ± 0.01 a	0.0681 ± 0.01 a	0.0892 ± 0.01 a
CSL	0.0375 ± 0.01 b	0.0686 ± 0.01 a	0.0705 ± 0.01 a	0.0773 ± 0.01 a
UAAAN	0.0656 ± 0.01 a	0.0709 ± 0.01 a	0.0663 ± 0.01 a	0.0864 ± 0.01 a

Los datos representan los valores medios ± error estándar. Letras diferentes en columnas corresponden a diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) dentro de un mismo factor dentro de una misma etapa del desarrollo de la inflorescencia de acuerdo a la Prueba de DMS de Fisher. (P) Pistilada, (E) Estaminada, (I) Inflorescencia, (C) Corona, (H) Hoja, (GC) General Cepeda, (CSL) Cañón de San Lorenzo, (UAAAN) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### ETAPA III. Balance de GA4/tZR y su efecto en la determinación del sexo en plantas adultas de *Dasyllirion cedrosanum*

#### 3.5. Determinación del balance de GA4/tZR en diferentes órganos de plantas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum*

El **Cuadro 15** muestra el MANOVA en el cual se observan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el contenido del balance de GA4/tZR entre sexo, órganos, localidades e interacciones. Según la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) las diferencias se encontraron entre sexos durante las etapas 2 y 3 después de la emergencia de la inflorescencia, en similitud con las diferencias encontradas para los niveles de GA4. Las plantas estaminadas mostraron valores más altos del balance GA4/tZR que las plantas pistiladas (**Cuadro 16**).

**Cuadro 15.** MANOVA correspondiente a la evaluación del balance de GA4/tZR (Prueba de  $\lambda$  de Wilks).

FACTOR	Valor ( $\lambda$ de Wilks)	F	Efecto de gl	Error de gl	p
Sexo (S)	0.74	3.99	4	45.00	0.007*
Órgano (O)	0.46	5.35	8	90.00	0.000*
Localidad (L)	0.33	8.47	8	90.00	0.000*
Sexo x Órgano x Localidad (S x O x L)	0.37	3.34	16	138.11	0.000*

gl= Grados de Libertad, p= probabilidad ( $p \leq 0.05$ ).

Al analizar los diferentes órganos (**Cuadro 16**), se observó que el balance de GA4/tZR varió durante el desarrollo de la inflorescencia, con valores en hojas igual a los de la inflorescencia, siendo estos superiores a los de la corona en la etapa 1, mientras en el segundo muestreo se observó que los valores del balance de GA4/tZR fueron superiores en hojas en comparación a los valores obtenidos para la inflorescencia, mientras estos últimos fueron iguales a los de la corona, durante el tercer muestreo los balances de estas hormonas fueron iguales en hojas y corona, y estos a su vez fueron superiores a los mostrados por la inflorescencia. Finalmente, durante la etapa 4 de muestreo los valores del balance hormonal fueron iguales entre los tres órganos de la planta. Al comparar entre localidades los valores de los balances de GA4/tZR, se observó que en la mayoría de las

etapas (con la excepción del segundo muestreo) los valores más altos fueron encontrados en plantas del CSL y UAAAN.

**Cuadro 16.** Media y Error Estándar de los valores del Balance GA4/tZR (mg/g de peso seco) en plantas de *Dasyilirion cedrosanum*.

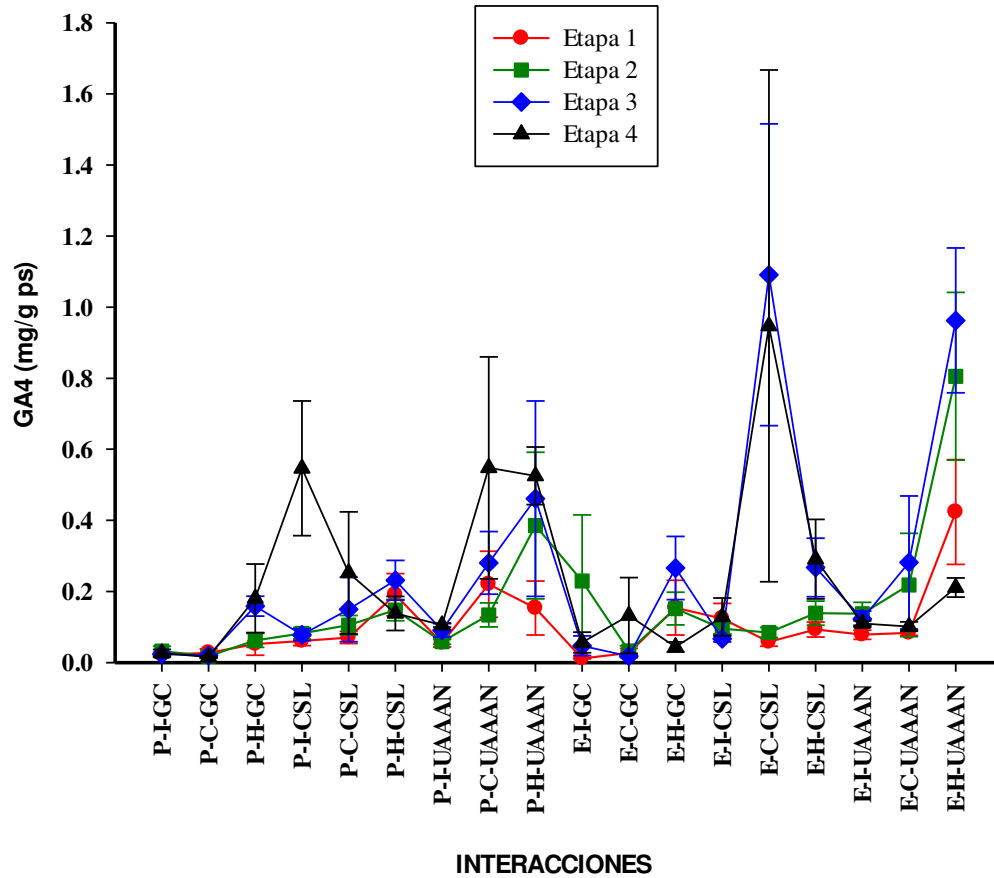
FACTOR	ETAPA			
	1	2	3	4
<b>Sexo</b>				
P	2.0700 ± 0.33 a	1.8640 ± 0.41 b	2.8789 ± 0.55 b	3.2801 ± 0.65 a
E	2.3520 ± 0.57 a	3.0483 ± 0.69 a	6.0901 ± 1.65 a	4.2620 ± 1.96 a
<b>Órgano</b>				
I	2.2899 ± 0.64 ab	1.9613 ± 0.50 b	1.4912 ± 0.31 b	2.5220 ± 0.70 a
C	1.2537 ± 0.26 b	1.3541 ± 0.23 b	6.2848 ± 2.27 a	5.2248 ± 2.95 a
H	3.0894 ± 0.66 a	4.0530 ± 1.01 a	5.6776 ± 1.19 a	3.5664 ± 0.61 a
<b>Localidad</b>				
GC	0.6383 ± 0.14 b	1.2511 ± 0.45 b	1.4947 ± 0.39 b	0.8611 ± 0.23 b
CSL	3.2179 ± 0.57 a	1.9978 ± 0.24 b	6.4121 ± 2.06 a	6.6702 ± 2.67 a
UAAAN	2.9655 ± 0.75 a	4.6739 ± 1.18 a	5.9008 ± 1.43 a	3.7856 ± 0.66 ab

Los datos representan los valores medios ± error estándar. Letras diferentes en columnas corresponden a diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) dentro de un mismo factor dentro de una misma etapa del desarrollo de la inflorescencia de acuerdo a la Prueba de DMS de Fisher. (P) Pistilada, (E) Estaminada, (I) Inflorescencia, (C) Corona, (H) Hoja, (GC) General Cepeda, (CSL) Cañón de San Lorenzo, (UAAAN) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### 3.6. Análisis de la interacción entre los factores sexo, órgano y localidad para GA4, tZR y el balance de GA4/tZR

El efecto de la interacción del sexo, órgano y localidad (**Figura 5**) mostró que en la localidad de la UAAAN los niveles más altos de GA4 fueron cuantificados en las hojas de planta estaminadas colectadas durante las etapas 1, 2, y 3 del desarrollo de la inflorescencia.

Sin embrago, en las plantas del CSL, los niveles más altos de GA4 se encontraron en la corona de las plantas estaminadas muestreadas durante las etapas 3 y 4. Finalmente, las plantas colectadas en GC presentaron los niveles más altos de GA4 en los tejidos de la inflorescencia obtenidos de plantas estaminadas, las cuales fueron colectadas durante la etapa 4 posterior a la emergencia de la inflorescencia.

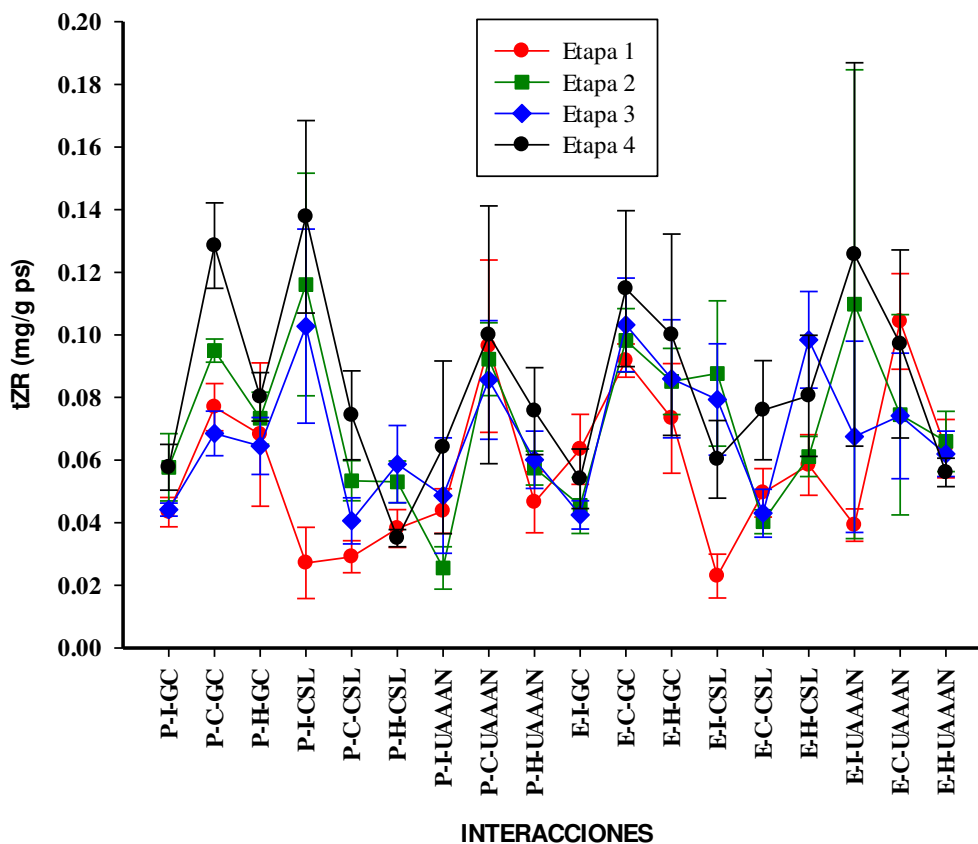


**Figura 5.** Comparación del efecto de la interacción de los factores sexo, órgano y localidad sobre la media y el error estándar de la concentración de GA4 en plantas de *D. cedrosanum*. (P) Pistiladas, (E) Estaminadas, (I) Inflorescencia, (C) Corona, (H) Hoja, (GC) General Cepeda, (CSL) Cañón de San Lorenzo, (UAAAN) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Para el caso de la tZR la **Figura 6** muestra que los niveles más altos de esta fitohormona se encontraron en el tejido de la inflorescencia de plantas estaminadas colectadas en la UAAAN durante la etapa 2 y 4.

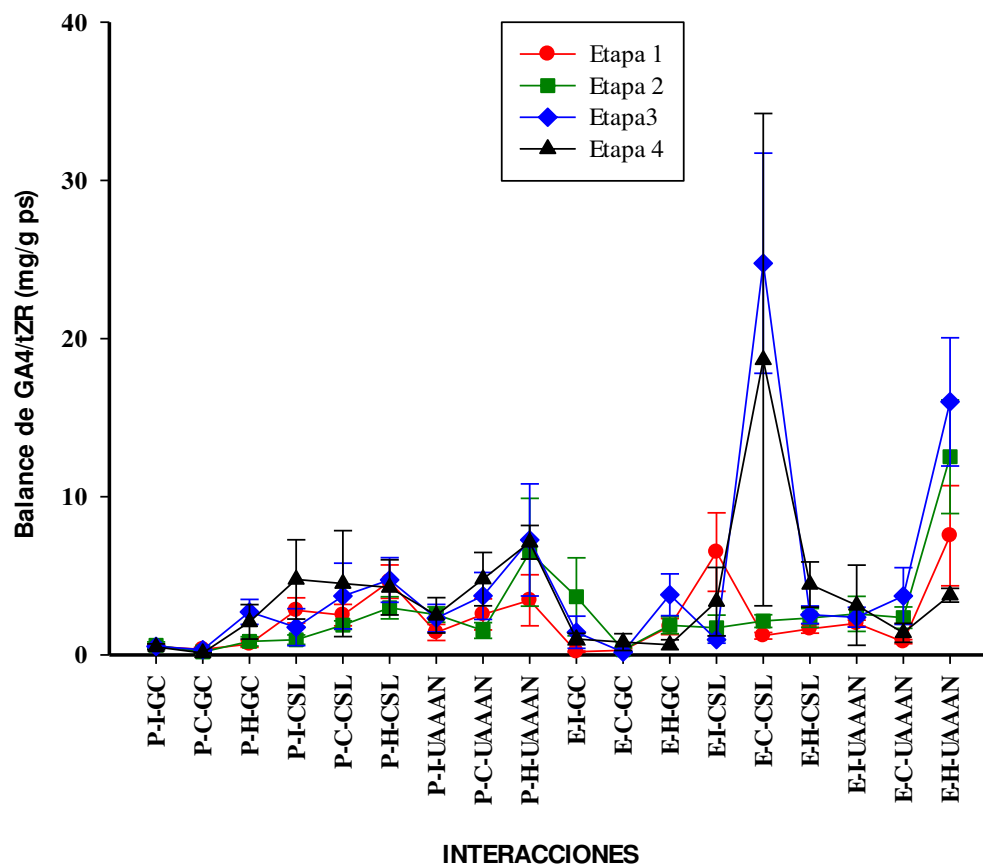
Comparando los órganos, el contenido más alto de tZR se observó en la corona durante las etapas 1 y 4 del desarrollo de la inflorescencia, sin embargo, no se presentó diferencia en el contenido de esta hormona entre plantas de diferente sexo. En las plantas obtenidas de GC los niveles de tZR más altos se encontraron en la corona tanto de plantas estaminadas como pistiladas muestreadas durante la etapa 4. Finalmente, los niveles de tZR más altos en las plantas de CSL fueron encontrados en los tejidos de la inflorescencia

de plantas pistiladas colectadas durante las etapas 2, 3 y 4. En la mayoría de los casos los niveles más bajos de tZR fueron encontrados en las hojas.



**Figura 6.** Comparación del efecto de la interacción de los factores sexo, órgano y localidad sobre la media y el error estándar de la concentración de tZR en plantas de *D. cedrosanum*. (P) Pistiladas, (E) Estaminadas, (I) Inflorescencia, (C) Corona, (H) Hoja, (GC) General Cepeda, (CSL) Cañón de San Lorenzo, (UAAAN) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Finalmente, los valores más altos resultantes del balance de GA4/tZR se calcularon a partir de los valores de GA4 y tZR cuantificados en los tejidos de las hojas colectadas durante la etapa 1, 2 y 3 a partir de plantas estaminadas procedentes de la localidad de la UAAAN. Por otro lado, en la localidad de CSL los valores más altos del balance de GA4/tZR fueron encontrados en la corona de plantas estaminadas muestreadas durante las etapas 3 y 4. Las plantas estaminadas y pistiladas de la localidad de GC presentaron los valores más bajos del balance de GA4/tZR (**Figura 7**).



**Figura 7.** Comparación del efecto de la interacción de los factores sexo, órgano y localidad sobre la media y el error estándar de los valores del balance de GA4/tZR en plantas de *D. cedrosanum*. (P) Pistiladas, (E) Estaminadas, (I) Inflorescencia, (C) Corona, (H) Hoja, (GC) General Cepeda, (CSL) Cañón de San Lorenzo, (UAAAN) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.



## 4. DISCUSIÓN

### **ETAPA I. Selección de la técnica de extracción y estandarización de los métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de GA4 y tZR**

#### **4.1. Estandarización de la técnica de extracción para GA4 y tZR**

Los solventes y las proporciones de éstos que formaron la mezcla para la extracción de GA4 y tZR fueron seleccionados partir de técnicas reportadas por diferentes autores (Shindy y Smith, 1975; Hou *et al.*, 2008; Giannarelli *et al.*, 2010; Soldatova y Khryanin, 2010; Gupta *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayoría de estos autores han formado dichas técnicas a partir de un solvente de extracción reportado ampliamente para la extracción de fitohormonas. La mezcla se conforma de metanol, cloroformo, agua y ácido fórmico, en una proporción de 12:5:2:1 (v/v) (Bieleski, 1964; Ivanov y Kamínek, 2002). Aunque se ha observado que la presencia del cloroformo en la mezcla, causa problemas asociadas con la extracción de grandes cantidades de material lipídico, por lo cual, frecuentemente el cloroformo es omitido (Singh *et al.*, 1988; Ivanov y Kamínek, 2002). Cada uno de los autores que han usado el mezcla de extracción de Bieleski o alguna modificación de esta, así como otras técnicas diferentes a la reportada por Bieleski, han reportado diferentes parámetros en la técnica de extracción, entre los cuales varia el tiempo de centrifugación, las revoluciones por minuto, volumen de la mezcla y el peso de la muestra. Por lo cual, se hicieron diversas pruebas variando los valores de los parámetros de extracción para estandarizar la técnica a usar para la extracción de GA4 y tZR.

#### **4.2. Estandarización de la metodología cromatográfica para la cuantificación de GA4 y tZR**

La metodología cromatográfica para la identificación y cuantificación de GA4 y tZR fue estandarizada a partir de parámetros reportados en diversos métodos cromatográficos destinados a la determinación de giberelinas y citocininas, así como para otras hormonas como, el ácido abscísico y el ácido indolacético (Atici *et al.*, 2005;

Soldatova y Khryanin, 2010; Gupta *et al.*, 2011). Entre los parámetros que variaron entre las diferentes metodologías reportadas se encuentra el uso de los solventes que forman las fases móviles: metanol y el acetonitrilo. La velocidad de flujo y las proporciones de las fases móviles fueron otros de los parámetros que se tuvieron que probar con diferentes valores altos y bajos para determinar el apropiado a usar para cada una de las fitohormonas a evaluar (GA4 y tZR), ya que estos dos parámetros no coinciden entre las diferentes técnicas. La longitud de onda que reportan Gupta *et al.* (2011) y Atici *et al.* (2005) para las giberelinas A3 es de 265nm, en nuestro caso la GA4 se separó y formó el pico más definido a los 205nm. Por otro lado, Soldatova y Khryanin, (2010) reportó que GA3 se separaba a los 204nm, longitud de onda muy parecida a la cual se separó mejor la GA4, mientras para zeatina reportó una longitud de onda de 210nm y en nuestro caso la tZR fue mejor identificada y cuantificada a los 268nm. En todos los casos se usó un detector UV y una columna C18, esta última con variaciones en el diámetro del poro interno y la longitud.

## **ETAPA II. Cuantificación de GA4 y tZR en plantas adultas de *Dasyllirion cedrosanum***

### **4.3. Concentraciones de GA4 y tZR en órganos de plantas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum***

Los valores de los **Cuadros 12 y 14** indican que solo los niveles de GA4 difieren en plantas de diferente sexo durante las etapas 2 y 3 del desarrollo de la inflorescencia. Estos resultados también afectan el balance de GA4/tZR, cuyos valores más altos se mostraron durante las etapas 2 y 3 de muestreo. Resultados similares a estos fueron reportados por Pimenta *et al.* (2012), quienes analizaron los niveles endógenos de 7 giberelinas (GA4, GA9, GA12, GA15, GA24, GA34 y GA51) en 5 etapas de desarrollo del estambre en plantas con flores masculinas de *Cucurbita maxima* L. El objetivo de los autores fue determinar si existía una relación entre las giberelinas y la aparición de rasgos específicos de flores masculinas, encontrando altos niveles de giberelinas en estambres en comparación con los niveles encontrados en otros tejidos de las flores masculinas, los valores más altos de GA4 fueron encontrados después de la etapa 3 del desarrollo del

estambre. Sin embargo, hubo un incremento generalizado de la mayoría de las giberelinas en los tejidos de las flores estaminadas; por lo tanto, los autores señalaron a las giberelinas como esenciales para el desarrollo de la flores masculinas de *Cucurbita máxima* (Pimenta *et al*, 2012).

Los niveles más altos de GA4 en *D. cedrosanum* fueron encontrados en los tejidos de las hojas, dichos resultados son diferentes a los reportados por Zanewich, (1993), quién evaluó los niveles de Giberelina A1 (GA1), Giberelina A19 (GA19) y Giberelina A20 (GA20) en diferentes órganos de la planta *Brassica napus* con una edad de 28 días, en la cual se encontró los valores más altos de las 3 giberelinas en la punta de los brotes (valores entre 10 y 20 ng/g de peso seco), seguido de los tallos medios, el hipocotiledón, y finalmente, las raíces, estas últimas con los niveles más bajos de GA1, GA19 y GA20 (valores por debajo de los 2.5 ng/g de peso seco). Posterior a los 64 días de edad de la planta, fueron analizados otros órganos, tales como, los tallos de las inflorescencias, el tallo, las hojas, las raíces y las flores; encontrándose los niveles más altos en las flores (valores entre 3 y 6 ng/g de pesos seco), seguidos de las hojas, los tallos y los tallos de las inflorescencias, mientras los contenidos más bajos se cuantificaron en las raíces (valores por debajo de 1ng/ g de peso seco). La punta de los brotes fueron los órganos con mayor contenido de giberelinas dentro de todos los órganos evaluados a los 2 y 64 días de edad de la planta.

Por otro lado, los resultados que muestran una variación de la GA4 entre la semana 3 y 4 del desarrollo del escapo o inflorescencia (período en el cual ya se sabe si la planta tiene flores estaminadas o pistiladas), se pueden explicar con lo reportado por Griffiths *et al*. (2006) quienes indican que después de la inducción floral, una vía de señalización funcional de GA no es requerida para la especificación y diferenciación de órganos florales, pero es esencial para el desarrollo normal de estos órganos. Contrario a lo anterior, estudios previos muestran que en plantas de días neutros, tales como el girasol y *Zantedeschia*, las giberelinas endógenas incrementan antes de la diferenciación de la inflorescencia, lo que implica la participación de las giberelinas en el proceso de floración (Almeida y Pareira, 1996).

Hay controversias acerca de la función atribuida a las giberelinas durante la diferenciación de los órganos sexuales en las plantas y en el desarrollo posterior de estos

órganos. Esto se debe a que el papel de las giberelinas en la floración está establecido para un número limitado de especies, por lo que no se ha establecido que las giberelinas sean un claro estímulo universal de la floración. En algunas especies, tales como, *Lolium temulentum* hay una evidencia convincente de que ésta actúa como una señal móvil para transmitir el estímulo de floración fotoperiódico, mientras en otras especies esta hormona parece tener una pequeña influencia sobre la iniciación floral y en muchas especies perianuales esta inhibe la floración (Mutasa y Hedden, 2009).

En el caso de las citocininas como la tZR, en el presente trabajo no se observó cambios durante el periodo del desarrollo de la inflorescencia, contrario a lo que reportaron Yamasaki y Yamashita, (1993), quienes observaron un aumento en la ribósido de zeatina antes de la iniciación de la floración, seguido de un aumento específico de la ribósido de zeatina justo después de la iniciación de este proceso, ambos procesos se observaron en las coronas de plantas de fresa. Otro trabajo que difieren a los resultados presentados en esta investigación, es los presentado por Carlson *et al.* (1987) quienes mostraron que los niveles endógenos de citocininas en el exudado del xilema de plantas de soya son relativamente más altos al inicio de la antesis y decrecen a medida que progresa la floración.

Menéndez *et al.* (2006) declararon que las giberelinas (GAs) juegan un importante papel en la determinación del sexo de los gametofitos del helecho *Blechnum spicant* L. Estos autores cuantificaron los niveles endógenos de GA1, GA3, GA4, GA7, GA9 y GA20 en gametofitos machos y hembras, cuyos resultados muestran que los niveles endógenos de giberelinas no son significativamente diferentes en gametofitos de diferente sexo. Sin embargo, los niveles de GA4, GA7 y GA20 fueron más altos en ambos sexos que los niveles de GA1, GA3 y GA9. Los reportes de Menéndez *et al.* (2006) son contrarios a los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde en la etapa 2 y 3 del desarrollo de la inflorescencia se observó una diferencia en los niveles de GA4 presentes en plantas de diferente sexo.

Hay efectos contrarios que se pueden observar en ciertas especies, tales como, *Chara vulgaris* (alga verde), en donde las giberelinas promueven el desarrollo de los órganos del sexo masculino. Sin embargo, en monocotiledóneas como el maíz, estas hormonas inducen la feminización (Vandenbussche *et al.*, 2007).

El efecto masculinizante de las giberelinas también ha sido observado en las plantas estaminadas de arroz y *Arabidopsis*, dicho efecto puede ser explicado por previos estudios cuyos resultados señalan que las giberelinas tienen un papel importante en la viabilidad del polen y desarrollo del tubo polínico (Singh *et al.*, 2002; Chhun *et al.*, 2007); así como, en el control del tiempo de la floración (Ouzounidou *et al.*, 2011).

Los resultados observados en el **Cuadro 14** muestran que la tZR no tiene un efecto feminizante en las plantas de *Dasyilirion cedrosanum*, al contrario de lo reportado para otras plantas. Sin embargo, el efecto feminizante de las citocininas en ciertos estudios ha sido contradicho, tal como lo reportan Louis *et al.* (1990) quienes indican que la trans zeatina (tZ) está relacionada con genes responsables de la feminización en *Mercurialis annua*, mientras su precursor la ribósido de trans-zeatina (tZR), ha sido identificada como un inductor de la masculinización en esta misma especie.

Es importante señalar que aunque un gran número de estudios muestran que la masculinización y la feminización es inducida por giberelinas y citocininas en plantas, tales como, *Cucumis sativus*, *M. annua*, *Z. mays* y *B. dactyloides* (Yin y Quinn, 1995a, 1995b; Boissay *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1999); este comportamiento no es generalizado, ya que otros estudios muestran que la diferenciación sexual en las plantas se asocia con otras fitohormonas, tales como, el etileno, ácido indolacético (IAA), ácido abscísico, isopenteniladenosina y ribósido de dihidrozeatina (Hamdi *et al.*, 1987; Marziani *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 2009).

En el caso particular *Asparagus officinalis*, especie que pertenece a la familia *Asparagaceae* al igual que *Dasyilirion cedrosanum*, se encontró una mayor concentración de ácido abscísico en flores estaminadas jóvenes en comparación del contenido encontrado en las flores pistiladas jóvenes (Marziani *et al.*, 1990).

Un estudio hecho por Trebitsh *et al.* (1997) demostró que en plantas de pepino la producción de flores de diferente sexo está influenciadas por hormonas diferentes a las giberelinas y citocininas, las plantas de pepino que fueron tratadas con una alta concentración de auxinas y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, un precursor de etileno) produjeron un aumento en las flores pistiladas y redujeron la producción de flores estaminadas.

Los reportes anteriores sirven de referencia para una posterior cuantificación de un espectro más amplio de fitohormonas, y la subsecuente determinación de una relación entre la diferenciación sexual y el comportamiento hormonal en la planta de *D. cedrosanum*. Con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, podemos deducir que en el caso de *D. cedrosanum*, la giberelina A4 (GA4) parece estar asociada con la aparición de flores estaminadas, mientras que la hormona tZR no mostró tener un efecto aparente entre plantas de diferente sexo.

#### **4.4. Análisis del efecto de la interacción de los factores de sexo, órgano y localidad sobre la concentración de GA4 y tZR**

Los resultados de las interacciones entre los tres factores (sexo, órgano y localidad) sobre las hormonas cuantificadas (GA4, tZR y balance GA4/tZR) mostraron los niveles más bajos de GA4 en la localidad de General Cepeda, este patrón posteriormente se refleja en el balance hormonal. No sabemos con certeza porque se observaron diferentes niveles de GA4 y tZR entre los órganos y las diferentes etapas de desarrollo de la inflorescencia en las plantas colectadas de diferentes localidades. Se cree que la producción de las hormonas, así como su efecto en la inducción de la floración y diferenciación de los órganos sexuales en las plantas se ve influenciado por factores, tales como, la irradiación, la temperatura y la humedad relativa (Bernier *et al.*, 1993) o la composición mineral del suelo (Sekimoto *et al.*, 1997). De acuerdo a esto, algunos autores reportan que una disminución en los niveles de GA1 en el maíz se relaciona con una deficiencia de Zn en la nutrición de la planta y que las aplicaciones foliares de ZnSO<sub>4</sub> aumentan el contenido de GA3 y los niveles de auxina en *Zea mays* (Tohidi *et al.*, 2013).

### **ETAPA III. Balance de GA4/tZR y su efecto en la determinación del sexo en plantas adultas de *Dasyllirion cedrosanum***

#### **4.5. Relación del balance de GA4/tZR en la determinación del sexo en *Dasyllirion cedrosanum***

No hay informes sobre la relación específica del balance de GA4/tZR necesaria para inducir feminización o masculinización de los órganos sexuales de las plantas. Sin embargo, ciertos estudios muestran que la concentración relativa de hormonas (balance hormonal) puede estar asociada con la diferenciación sexual. Un ejemplo de este efecto puede ser visto en el estudio de Stokes *et al.* (2003), quién cuantificó los niveles de diferentes giberelinas (GA18, GA19, GA29 y GA53) en inflorescencias jóvenes de ambos sexos de plantas de *Rumex acetosa* L. Los autores observaron niveles más altos de concentraciones relativas de GA18 y GA29 en plantas estaminadas ( $386.4 \pm 48.8$  pmol/g peso seco y  $363.9 \pm 57.1$  pmol/g peso seco, respectivamente) comparado con las plantas pistiladas ( $141.6 \pm 27.2$  peso seco y  $163.3 \pm 27.7$  pmol/g peso seco, respectivamente). Sin embargo, las concentraciones relativas más altas de GA19 y GA53 se presentaron en plantas pistiladas ( $538.5 \pm 92.4$  peso seco y  $228.8 \pm 22.0$  pmol/g peso seco, respectivamente) que en plantas estaminadas ( $278.3 \pm 51.2$  peso seco y  $156.4 \pm 23.1$  pmol/g peso seco, respectivamente).

Liu *et al.* (2008) dedujeron que un incremento en el contenido relativo de tZ/IAA y GA3/tZ índice la feminización de *Benincasa hispida* Cogn var. Chiehqua. Además, un contenido más alto de la hormona GA3 en los ápices del tallo conducen al desarrollo de flores femeninas en esta especie.

De acuerdo con el reporte de Khryanin (2007) la diferenciación de los órganos sexuales en las plantas está influenciada por factores genéticos, bioquímicos y ambientales. Por lo tanto, es probable que la determinación del sexo en muchas especies monoicas y dioicas dependa de más de uno de los factores antes mencionados.

Es importante que en la evaluación del efecto de las fitohormonas en la distinción de plantas pistiladas y estaminadas de cualquier planta sean considerados sus isómeros y conjugados, así como, la evaluación de fitohormonas adicionales a las giberelinas y citocininas, tales como, auxinas, ácido abscísico, y etileno (Kumar *et al.*, 2009). Por otra parte, una posible relación entre las proporciones de estas fitohormonas (balances hormonales) debe ser considerados como posibles efectores de diversas funciones en las plantas, entre ellas, la diferenciación sexual (Soldatova y Khryanin, 2010).

## 5. CONCLUSIONES

- Se implementó una técnica por cromatografía líquida para la cuantificación de cada fitohormona evaluada: Giberelina A4 y ribósido de trans-zeatina.
- Los niveles más altos de GA4 fueron encontrados en plantas estaminadas, mientras que la tZR no mostró diferencias entre plantas de diferente sexo.
- Los órganos con los niveles más altos de GA4 y del balance GA4/tZR fueron la corona y las hojas colectadas durante la etapa 3 (etapa de la aparición del polen y/o semillas) y la etapa 4 (inicio de la inflorescencia).
- La cuantificación de tZR mostró diferencias entre órganos solo en las etapas 1 y 4 (Etapas correspondientes a la emergencia y muerte de la inflorescencia, respectivamente), encontrándose los niveles más altos de esta fitohormona en la corona e inflorescencia durante la etapa 4.
- Los niveles de GA4 y del balance GA4/tZR variaron entre cada localidad, encontrándose los valores más altos en las plantas estaminadas colectadas en la UAAAN durante la etapa 3 y 4. No se detectaron diferencias en los niveles de tZR entre plantas colectadas de las tres localidades.
- La variación en los niveles de GA4 entre los órganos evaluados durante las diferentes etapas del desarrollo del órgano sexual indica una posible asociación de la hormona con la inducción floral, más no con la diferenciación sexual. Este comportamiento no se observó al evaluar tZR y el balance de GA4/tZR.



## 6. PERSPECTIVAS

**Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación dejan claro que es necesario:**

- Llevar a cabo un posterior análisis no solo de las fitohormonas GA4 y tZr, sino también, de sus variantes estructurales, isómeros y derivados glucosilados, al igual deben incluirse otras fitohormonas vinculadas con la diferenciación sexual en otras plantas, tales como: Ácido Indolacético, Ácido Abscísico, Brasinosteroides y Etileno.
- Evaluar el efecto que pudiera tener la aplicación exógena de las fitohormonas (GA4 y tZR) previa a la tercera semana del proceso de floración, esto con la finalidad de establecer si dicha aplicación puede inducir o cambiar el proceso de feminización o masculinización en flores de plantas de *D.cedrosanum* previamente identificadas como hembras o machos.
- Finalmente, después de una amplia búsqueda de información en los bancos de genes sobre el género *Dasyilirion* se sabe que no existen datos genéticos de esta planta, por lo cual sería muy importante iniciar con un proceso de secuenciación de los principales genes relacionados con la diferenciación sexual, de importancia comercial y bioquímica; ya que una vez obtenida dicha información se podría hacer uso de las técnicas moleculares para la investigación de los procesos genéticos involucrados en la determinación del sexo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth Ch. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany*. 86: 211-221.
- Aktas LY, Akca H, Altun N, Battal P. 2008. Phytohormone levels of drought acclimated laurel seedlings in semiarid conditions. *General and Applied Plant Physiology*. 34: 203-214.
- Almeida JAS, Pareira MFDA. 1996. The control of flower initiation by gibberellin in *Helianthus annuus* L. (sunflower), a non-photoperiodic plant. *Plant Growth Regulation*. 19: 109-115.
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*. 309: 741-745.
- Atici O, Agar G, Battal P. 2005. Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress. *Biologia Plantarum*. 49: 215-222.
- Audesirk T, Audesirk G, Byers BE. 2008. Biología: La vida en la Tierra. Ed Pearson Educación a México. 8<sup>va</sup> Edición. Estado de México. pp. 910-911.
- Azcón BJ, Talón M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2<sup>da</sup> Edición. Ed McGraw Hill. Madrid, España. pp. 651.
- Battal P, Turker M, Tilekiloğlu B. 2003. Effects of different mineral nutrients on abscisic acid in maize (*Zea mays*). *Annales Botanici Fennici*. 40: 301-308.
- Benavides MA, Hernández VREM, Ramirez RH, Sandoval Rangel A. 2010. Tratado de Botánica Económica Moderna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. pp. 332.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*. 5: 1147-1155.
- Bielecki RL. 1964. The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry*. 9(4): 431-442.
- Bogler DJ. 1994. Taxonomy and Phylogeny of *Dasyliirion* (Nolinaceae). Ph.D. dissertation. University of Texas. *Flora of North America*. 26: 413, 414, 422.

- Boissay E, Delaigue M, Sallaud C, Esnault R. 1996. Predominant Expression of a Peroxidase Gene in Staminate Flowers of *Mercurialis annua*. *Physiologia Plantarum*. 96: 251-257.
- Bracale M, Caporali E, Galli MG, Longo C, Marziani LG, Rossi G, Spada A, Soave C, Falavigna A, Raffaldi F, Maestri E, Restivo FM, Tassi F. 1991. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Science*. 80(1-2): 67-77.
- Burgos AM, Cenóz PJ, Prause J. 2009. Efecto de la aplicación de auxinas sobre el proceso de enraizamiento de estacas de dos cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *UDO Agrícola*. 9(3): 539-546.
- Carlson DR, Dyer DJ, Cotterman CD, Durley RC. 1987. The physiological basis for cytokinin induced increases in pod set in IX93-100 soybeans. *Plant Physiology*. 84: 233-239.
- Castillo QD, Sáenz RJT, Torres ELM, Sánchez AD. 2009. Tablas de producción para el inventario de cortadillo (*Nolina cespitifera* Trel.) en el sureste de Coahuila. *Revista de Ciencia Forestal en México*. 34: 15-174.
- Chailakhyan MKh, Khryanin VN. 1978. Effect of growth regulators and role of roots in sex expression in spinach. *Planta*. 142: 207-210.
- Charlesworth D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity*. 88: 94-101.
- Chhun T, Aya K, Asano K, Yamamoto E, Morinaka Y, Watanabe M, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi TM. 2007. Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *The Plant Cell*. 19: 3876-3888.
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York, NY. p. 842.
- Cruz RM, De la Garza TH, Aguilar GCN, Aguilera CA, Reyes VM, Rutiaga M, Rodríguez HR. 2013. Chemical and properties of sotol plants (*Dasylirion cedrosanum*) of different sex and its fermentation products. *International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences*. 3(1): 41-49.
- Cruz RM. 2007. Caracterización fisicoquímica y molecular de la planta hembra y macho del sotol y del producto de su fermentación. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. pp.44.

- Dahlgren RM, Clifford HT, Yeo PF. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, Evolution, and Taxonomy. Springer Link-Verlag, Berlin; New York. pp. 520.
- De La Garza HT, Martínez M, Lara L, Rodríguez RH, Rodríguez JM, Aguilar CN. 2008. Production of a Mexican Alcoholic Beverage: Sotol. *Research Journal of Biological Sciences*. 3(6): 566-571.
- Dellaporta SL, Calderon UA. 1993. Sex Determination in Flowering Plants. *The Plant Cell*. 5: 1241-1251.
- Dobrev PI, Kaminek M. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 950: 21-29.
- Durand R, Durand B. 1984. Sexual differentiation in higher plants. *Physiologia Plantarum*. 60: 267-274.
- Encina DJA, Zárate LA, Estrada CE, Valdés RJ, Villarreal QJÁ. 2009. Composición y aspectos estructurales de los bosques de encino de la sierra de Zapalinamé, Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana*. 86: 71-108.
- Encina DJA, Zárate LA, Valdés RJ, Villarreal QJÁ. 2007. Caracterización ecológica y diversidad de los bosques de encino de la sierra de Zapalinamé, Coahuila, México. *Boletín de Sociedad Botánica de México*. 81:51-63.
- Flores MS, Peña CE, López CR. 1999. Mejoradores orgánicos en la rehabilitación de un suelo salino de General Cepeda, Coahuila, México. *AGRARIA UAAAN*. 15(2): 47-62.
- Flórez RVJ, Alexio PMF. 2009. El Ácido Abscísico acelera el desarrollo floral de *Solidago* en días cortos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*. 62(1): 4835-4841.
- Franken AA. 1970. Sex characteristic and inheritance of sex in *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.). *Euphytica*. 19: 277-287.
- Galli MG, Bracale M, Falavigna A, Soave C. 1988. Sexual differentiation in *Asparagus officinalis* L. I. DNA characterization and mRNA activities in male and female flowers. *Sexual Plant Reproduction*. 1: 202-207.
- Galoch E. 1978. The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 47: 135-161.

- Giannarelli S, Muscatello B, Bogani P, Spiriti MM, Buiatti M, Fuoco R. 2010. Comparative determination of some phytohormones in wild-type and genetically modified plants by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 398: 60-68.
- Giraldo CI, Rengifo L, Aguilar E, Gaviria D, Alegría AH. 2004. Determinación del sexo en borojó (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6(2): 9-14.
- Giulini A, Wang J, Jackson D. 2004. Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. *Nature*. 430: 1031-1034.
- Godoy JA. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*. 18(1): 23-33.
- Golan GA, Barazani O, Wang ZS, Khadka DK, Saunders JA, Kostiukovsky V, Rowland LJ. 2004. Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution*. 246(1): 9-18.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG. 2006. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 18: 3399-3414.
- Gupta V, Kumar M, Brahmabhatt H, Reddy CRK, Seth A, Jha B. 2011. Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49: 1259-1263.
- Hamdi S, Teller G, Louis JP. 1987. Master Regulatory Genes, Auxin Levels, and Sexual Organogenesis in the Dioecious Plant *Mercurialis annua*. *Plant Physiology*. 85: 393-399.
- Hernández QJD. 2012. Estudio Cromosómico y de la Estructura de la Propagación de Sexos en Sotol (*Dasylirion cedrosanum*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. pp. 28.
- Heslop JH, Heslop YH. 1957. The effect of carbon monoxide on sexuality in *Mercurialis ambigua* L. fil. *New Phytologist*. 56(3): 352-355.

- Hou S, Zhu J, Ding M, Guohua Lv. 2008. Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*. 76: 798-802.
- Hutchinson J. 1934. The families of flowering plants. Monocotyledons. Clarendon Press, Oxford, Estados Unidos. p. 532.
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Registros del clima del 2014 en los municipios de Saltillo y General Cepeda. Revisado en Abril del 2015.
- Irish EE. 1996. Regulation of Sex Determination in Maize. *BioEssays*. 18: 363-369.
- Jordán M, Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, Chile. 15: 1-28.
- Juarez C, Banks JA. 1998. Sex determination in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 1(1): 68-72.
- Khryanin VN. 2002. Role of phytohormones in sex differentiation in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 49: 545-551.
- Khryanin VN. 2007. Evolution of the Pathways of Sex Differentiation in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54(6): 845-852. Original Russian Text, published in *Fiziologiya Rastenii*. 2007. 54(6): 945-952.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*. 103: 814-819.
- Kumar V, Parvatam G, Ravishankar GA. 2009. AgNO<sub>3</sub> - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12(2): 1-15.
- Lazarte JE, Palser BF. 1979. Morphology, vascular anatomy and embryology of pistillate and staminate flowers of *Asparagus officinalis* L. *American Journal of Botany*. 66: 753-764.

- Lebel HS, Grant SR. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science*. 2: 130-136.
- Leung J, Giraudat J. 1998. Absciscic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 199-222.
- Liu H, Li X, Xiao J, Wang S. 2012. A convenient method for simultaneous quantification of multiple phytohormones and metabolites: application in study of rice-bacterium interaction. *Plant Methods*. 8(1): 2-12.
- Liu H, Song S, Chen R, Sun G. 2008. The effect of hormones on female flower differentiation in wax. *Acta Horticulturae*. 1(774): 30-313.
- Lizada M, Yang SF. 1979. Simple and sensitive assay for 1-aminocyclo- propane-I carboxylic acid. *Analytical Biochemistry*. 100: 140-145.
- López BLA. 2005. El Sotol en Coahuila, potencialidades y limitaciones. BEBIDAS Y REGIONES. Historia e impacto de la cultura etílica en México. pp. 66-73.
- Louis JP, Augur C, Teller G. 1990. Cytokinins and Differentiation Processes in *Mercurialis annua*. *Plant Physiology*. 94: 1535-1541.
- Martínez MC. 2013. Implicación de los genes de biosíntesis y señalización de etileno en la determinación sexual, y el cuajado y desarrollo partenocárpico del fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.). Tesis Doctoral. Univeridad de Almería. España. pp. 7-10.
- Marziani LGP, Rossi G, Scaglione G, Longo CP, Soave C. 1990. Sexual differentiation in *Asparagus officinalis* L. III. Hormonal content and peroxidase isoenzymes in female and male plants. *Sexual Plant Reproduction*. 3: 236-243.
- Menéndez V, Revilla MA, Bernard P, Gotor V, Fernández H. 2006. Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Reports*. 25(10): 1104-1110.
- Mercier H, Souza BM, Kraus JE, Hamasaki RM, Sotta B. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 15:107-112.
- Ming R, Wang J, Moore PH, Paterson AH. 2007. Sex chromosomes in flowering plants. *American Journal of Botany*. 94(2): 141-150.

- Munné BS, Lopez CM, Alegrea L, Van Onckelenb HA. 2002. Effect of drought and high solar radiation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid concentrations in *Rosmarinus officinalis* plants. *Physiologia Plantarum*. 114: 380-386.
- Mutasa GE, Hedden P. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*. 60(7): 1979-1989.
- Negi SS, Olmo HP. 1966. Sex conversion in male *Vitis vinifera* L. by a kinin. *Science*. 152: 1624-1625.
- Negrutiu I, Vyskot B, Barbaca N, Georgiev S, Moneger F. 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology*. 127: 1418-1424.
- Neuberg LM, Pavlíková D, Žižková E, Motyka V, Pavlík M. 2011. Different types of N nutrition and their impact on endogenous cytokinin levels in *Festulolium* and *Trifolium pratense* L. *Plant, Soil and Environment*. 57(8): 381-387.
- Norato RJ, Espejo N. 1985. Efectos del AG3, Ethrel y ANA en la Expresión Sexual de *Luffa cylindrica* L. *Acta Biológica Colombiana*. 1(2): 91-97.
- NORMA OFICIAL MEXICANA (2000) (NOM-021-RECNAT-2000). Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- NORMA OFICIAL MEXICANA. (2004). (NOM-159-SCFI-2004). Bebidas alcohólicas-sotol-especificaciones y métodos de prueba.
- Olhagaray E. 1994. Diagnóstico de la actividad forestal en la Región Lagunera. Avances de Investigación. CIFAP-RASPA. INIFAP. México. pp. 22.
- Olhagaray REC, Esparza ChG, Vega SF. 2004. Producción y comercialización de licores de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) en Durango México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 29(95): 83-90.
- Onanuga AO, Jiang P, Adl S. 2012. Determination of Endogenous Hormones Content in Cotton Varieties (*Gossypiumhirsutum*) as Influenced by Phosphorus and Potassium Nutrition. *Journal of Agricultural Science*. 4(7): 76-84.



- Ouzounidou G, Giannakoula A, Asfi M, Ilias I. 2011. Differential responses of onion and garlic against plant growth regulators. *Pakistan Journal of Botany*. 43(4): 2051-2057.
- Papadopoulou E, Grumet R. 2005. Brassinosteroid-induced Femaleness in Cucumber and Relationship to Ethylene Production. *HortScience*. 40(6): 1763-1767.
- Parasnis A, Gupta V, Tamhankar S, Ranjekar P. 2000. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Molecular Breeding*. 6: 337-344.
- Parrish TL, Koelewijn HP, van Dijk PJ. 2004. Identification of a male-specific AFLP marker in a functionally dioecious fig, *Ficus fulva* Reinw. ex Bl. (Moraceae). *Sexual Plant Reproduction*. 17(1): 17-22.
- Peil A, Flachowasky H, Schumann E, Weber WE. 2003. Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 107(1): 102-109.
- Petre Ivanov DP, Kamínek M. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 950:21-29.
- Pharis RP, Kou CG. 1977. Physiology of gibberellins in conifers. *Canadian Journal of Forest Research*. 7(2): 299-325.
- Pimenta LMJ, Knop N, Lange T. 2012. Stamen derived bioactive gibberellin is essential for male flower development of *Cucurbita maxima* L. *Journal of Experimental Botany*. 63(7): 2681-2691.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 1992. Biología de las Plantas. Volumen 2. 4<sup>ta</sup> Edición. Ed Reverte. Barcelona, España. pp. 402.
- Reamon BSM, Jung C. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 100(3): 432-438.
- Robles EA, España MJL. 2008. Biomasa y forraje, distribución espacial y abundancia de la planta de sotol (*Dasylirion spp.*) en el ejido El Jazmín, Mazapil, Zacatecas, México. *Revista de Investigación Científica*. 4(2): 1-9.
- Rudich J. 1990. Biochemical aspects of hormonal regulation of sex expression in cucurbits. In: Biology and utilization of the *Cucurbitaceae*. Bates, D.M.,

- Robinson, R. W., Jeffrey, C. (eds). Biology and utilization of the *Cucurbitaceae*. Cornell University Press. N.Y, U.S.A. pp. 269-280.
- Sadava D, Heller G, Orians G, Purves W, Hillis D. 2009. Vida: La ciencia de la Biología. 8<sup>va</sup> Edición. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. pp. 798.
- Santner A, Calderon VLIA, Estelle M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*. 5(5): 301-307.
- SCFI, 2004. (SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL). NOM-159-SCFI-2004. Bebidas alcohólicas-sotol-especificaciones y métodos de prueba. 16 de Junio del 2004. pp. 1-29.
- Scutt CP, Li Y, Robertson SE, Willis ME, Gilmartin PM. 1997. Sex Determination in Dioecious *Silene latifolia*. *Plant Physiology*. 114: 969-979.
- Sekimoto H, Hoshi M, Nomura T, Yokota T. 1997. Zinc Deficiency Affects the Levels of Endogenous Gibberellins in *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology*. 38(9): 1087-1090.
- Shindy WW, Smith OE. 1975. Identification of Plant Hormones from Cotton Ovules. *Plant Physiology*. 55: 550-554.
- Singh DP, Jermakow AM, Swain SM. 2002. Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 14: 3133-3147.
- Singh S, Letham DS, Jameson PE, Zhang R, Parker CW, Jane Bandenoch JJ, Nooden LD. 1988. Cytokinin Biochemistry in Relation to Leaf Senescence IV. Cytokinin Metabolism In Soybean Explants. *Plant Physiology*. 88: 788-794.
- Sola CPJ, Herrán R, Ruiz RC, Navajas PR. 2012. Plant Sex-Chromosomes Evolution. In: New Insights on Plant Sex Chromosomes. Nova Sciencie Publishers Inc. Series: Botanical Research and Practices. pp. 1-20. (ISBN: 978-1-61470-236-8).
- Soldatova NA, Khryanin VN. 2010. The effects of heavy metal salts on the phytohormonal status and sex expression in marijuana. *Russian Journal of Plant Physiology*. 57: 96-100.
- Stehlik I, Blattner FR. 2004. Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivalis* (Polygonaceae) and implications for the evolution of sex chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*. 108(2): 238-242.

- Stokes TS, Croker SJ, Hanke DE. 2003. Developing Inflorescences of Male and Female *Rumex acetosa* L. Show Differences in Gibberellin Content. *Journal of Plant Growth Regulation*. 22: 228-239.
- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H. 2002. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*. 53: 971-977.
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H. 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*. 45: 1028-1036.
- Tanurdzic M, Banks JA. 2004. Sex-Determining Mechanisms in Land Plants. *The Plant Cell*. 16: S61-S71.
- Tewari G, Kumar SM, Kaur S, Sharma YK. 2009. Effect of IAA on flowering responses, metabolites and enzymes in *Cucumis sativus*. *Research in Environment and Life Sciences*. 2(4):219-222.
- Tohidi HRM, Zahedi H, Ashkiani A. 2013. Effect of zinc foliar application on auxin and gibberellin hormones and catalase and superoxide dismutase enzyme activity of corn (*Zea mays* L) under water stress. *Maydica*. 58: 218-223.
- Trebitsh T, Staub JE, O'Neil SD. 1997. Identification of a 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene Linked to the Female (F) Locus That Enhances Female Sex Expression in Cucumber. *Plant Physiology*. 113: 987-995.
- Trelease W. 1911. The desert group *Nolineae*. *Proceedings of the American Philosophical Society*. 50: 404-443.
- Tudzynski B, Kawaide H, Kamiya Y. 1998. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. *Current Genetics*. 34: 234-240.
- United States Department of Agriculture USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=DASY> L. (Consultado:10 de Julio del 2014).

- Vaclav D, Adam V, Havel L, Kizek R. 2009. Phytohormones as important biologically active molecules-their simple simultaneous detection. *Molecules*. 14: 1825-1839.
- Vandenbussche F, Fierro A, Wiedemann G, Reski R, Van der Straeten D. 2007. Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components. *BMC Plant Biology*. 7: 65-82.
- Vines RA. 1960. Trees, shrubs, and woody vines of the Southwest. Austin, TX: University of Texas Press. pp. 1104.
- Vyskot B, Hobza R. 2004. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends in Genetics*. 20(9): 432-438.
- Wang XM, Song WQ, Liu S, Li XL, Chen RY. 2001. AFLP markers related to sex in a dioecious plant, *Ginkgo biloba*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*. 34(1): 5-9.
- Weaver RJ. 1996. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed Trillas. Distrito Federal, México. pp. 622.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 98: 10487-10492.
- Westergaard M. 1958. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Advances in Genetics*. 9: 217-281.
- Xiong L, Zhu JK. 2003. Regulation of Absciscic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*. 133: 29-36.
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 225-251.
- Yamasaki A, Yamashita M. 1993. Changes in endogenous cytokinins during flower induction of strawberry. *Acta Horticulturae*. 345: 93-99.
- Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H. 2005. Hormonal Regulation of Sex Expression in Plants. *Vitamins Hormones*. 72: 79-100.
- Yampolsky C, Yampolsky H. 1922. Distribution of the sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica*. 3: 1-62.
- Yin TJ, Quinn JA. 1995a. Test of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Buchloe dactiloides* (Poaceae). *American Journal of Botany*. 82: 745-751.

- Yin TJ, Quinn JA. 1995b. Test of Mechanistic Model of One Hormone Regulation Both Sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*. 82: 1537-1546.
- Yu H, Ito T, Zhao Y, Jinrong P, Kumar P, Meyerowitz EM. 2004. Floral homeoplastic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(20): 7827-7832.
- Zanewich KP. 1993. Vernalization and Gibberellin Physiology of Winter Canola. Tesis de Maestría. pp. 43-46.
- Zappler G, Ivy ET, Poo J. 1996. Learn about Texas Indians. University of Texas Press. pp.4. (ISBN: 0292716842, 9780292716841).
- Zárate LA. 2003. Poblaciones y su condición: Estudio regional del sotol. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Secretaría de Fomento Agropecuario, Gobierno del Estado de Coahuila. pp. 11-14.
- Zhao D, Han Y, Fu Y, Guo F, Meng F. 1999. Changes of plant hormones in inflorescence during sex determination in maize. *Acta Phytophysiologica Sinica*. 25: 57-65.
- Zuccarini JG. 1838. *Dasyllirion*. *Allgemeine Gartenzeitung*. 6(33): 258,431-432.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

***Erika Nohemi Rivas Martínez***

**Candidato para el Grado de**

Doctor en Ciencias con Acentuación en  
Manejo y Administración de Recursos Vegetales

**Tesis:** Determinante Hormonal en la Diferenciación Sexual de *Dasyilirion Cedrosanum* Trel. (Trelease, 1911).

**Campo de Estudio:** Ciencias Naturales (Ciencias Bioquímicas).

**Datos Personales:** Nacida en Monclova, Coahuila, México el 02 de Agosto de 1985. Hija mayor de la Sra. María San Juanita Martínez Contreras y el Sr. Oscar Alfonso Rivas García.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Coahuila, en donde obtuvo el grado de Licenciatura como Químico Farmacobiólogo con Acentuación en Microbiología en el 2007, y el grado de Maestra en Ciencias con Acentuación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos en el 2010.

**Experiencia Laboral:** Responsable del Laboratorio de Fisiología Vegetal en el Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro e Impartición del Curso de Biología Celular y Desarrollo Analítico en la Universidad del Valle de México.

### Artículos con Arbitraje

- **GA4 and tZR quantification in pistillate and staminate plants of *Dasyilirion cedrosanum*.** Rivas-Martínez, E.N., R. Foroughbakchik-Pournavab, M.H. Reyes-Valdés, A. Benavides-Mendoza. Aceptado para publicarse en el Volumen 48, Número 3, en la publicación de Junio del 2016 en la *Pakistan Journal of Botany*.
- **Determinación de giberelina A4 y trans zeatina ribósido en diferentes órganos de *Dasyilirion cedrosanum*.** Erika Nohemi Rivas Martínez, Rahim Foroughbakhch Pournavab, Manuel Humberto Reyes Valdés y Adalberto Benavides Mendoza. Aceptado para ser publicado en el Volumen 7, Número 8, den la publicación del 12 de noviembre al 31 de diciembre del 2016 en la *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.

**DETERMINACIÓN DE GIBERELINA A4 Y TRANS ZEATINA RIBÓSIDO EN  
DIFERENTES ÓRGANOS DE *DASYLIRION CEDROSANUM***

**Erika Nohemi Rivas Martínez<sup>1</sup>, Rahim Foroughbakhch Pournavab<sup>1</sup>, Manuel  
Humberto Reyes Valdés<sup>2</sup>, Adalberto Benavides Mendoza<sup>3,\*</sup>.**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Botánica, Av. Pedro de Alba,  
s/n, cruz con Av. Manuel L. Barragán, CP. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León,  
México. Tel: (52)818-114-3465 (rahimforo@hotmail.com, erikanoehemi257@gmail.com).

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento,  
Calzada Antonio Narro, #1923, Col. Buenavista CP. 25315, Saltillo, Coahuila, México.  
Tel: (52)844-411-0296. (mathgenome@gmail.com). <sup>3</sup>Universidad Autónoma Agraria  
Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Col.  
Buenavista CP. 25315, Saltillo, Coahuila, México. Tel. (52)844411-0303. Autor para  
correspondencia (abenmen@gmail.com).

**RESUMEN**

*Dasyilirion cedrosanum* es una planta dioica de importancia comercial en la  
industria de las bebidas alcohólicas, de la cual se desconoce su composición bioquímica y  
fisiología hormonal. Debido a la importancia fisiológica que tienen las fitohormonas en la  
formación, desarrollo y diferenciación de tejidos se consideró la cuantificación de la  
Giberelina A4 y trans Zeatina Ribósido en diferentes órganos de plantas estaminadas y  
pistiladas de *D. cedrosanum*. La cuantificación de ambas hormonas se realizó en hojas,  
corona e inflorescencia de plantas de *Dasyilirion cedrosanum* colectadas en el 2013 en  
General Cepeda, México. Los valores más altos de GA4 fueron encontrados en las hojas  
( $0.10 \pm 0.02$  mg/g ps y  $0.15 \pm 0.03$  mg/g ps) sin observarse diferencias entre sexos. El  
mayor contenido de tZR fue cuantificado en las coronas ( $0.09 \pm 0.01$  mg/g ps y  $0.10 \pm 0.00$

mg/g ps) de plantas estaminadas y pistiladas, así como en las hojas de plantas estaminadas (0.09 ± 0.01 mg/g ps). Solo el promedio global de GA4 denotó diferencias, presentándose el valor más alto en las plantas estaminadas. Los niveles cuantificados en cada uno de los órganos son un punto de partida para establecer las bases fisiológicas de las respuestas hormonales en las plantas de *Dasyilirion cedrosanum*.

**Palabras clave:** *Dasyilirion cedrosanum*, dioecia, fitohormonas, órganos.

## ABSTRACT

*Dasyilirion cedrosanum* is a dioecious plant of commercial importance in the alcoholic beverage industry, which biochemical and hormonal physiology is unknown. Because of the physiological importance of phytohormones in the formation, development and differentiation of tissues was considered the quantitation of Gibberellin A4 and trans Zeatin Riboside in different organs of pistillate and staminate plants of *D. cedrosanum*. Quantification of both hormones was performed on leaves, crown and inflorescence from plants *Dasyilirion cedrosanum* collected in 2013 in General Cepeda, Mexico. Higher values of GA4 were found in the leaves (0.10 ± 0.02 mg / g dw and 0.15 ± 0.03 mg / g dw) with no differences between sexes. The highest content of tZR was quantified in the crowns (0.09 ± 0.01 mg / g dw and 0.10 ± 0.00 mg / g dw) of staminate and pistillate plants, as well as, in the leaves of staminate plants (0.09 ± 0.01 mg / g dw). Only the global average of GA4 denotes differences, presenting the highest value in the staminate plants. The quantized levels of GA4 and tZR in each organ are a starting point to establish the physiological basis of hormonal responses in plants of *Dasyilirion cedrosanum*.

**Keywords:** *Dasyilirion cedrosanum*, dioecy, phytohormones, organs.



## 1   **INTRODUCCIÓN**

2

3           Dentro de las plantas dioicas con importancia comercial encontramos a las del  
4   género *Dasyilirion*, el cual recientemente ha sido ubicado dentro de la familia *Asparagaceae*  
5   (APG III, 2009) y cuya distribución comprende la región del desierto Chihuahuense y la  
6   Región Árida del Norte de América (Martorell y Ezcurra, 2002). La importancia de las  
7   plantas de este género radica en que algunas de sus especies como lo son: *D. duranguense*,  
8   *D. wheeleri* y *D. cedrosanum* son empleadas para la elaboración de una bebida alcohólica  
9   conocida con el nombre de “sotol” (De La Garza *et al.*, 2008; NOM-159-SCFI-2004). La  
10   elaboración artesanal de esta bebida y la escasa información sobre la biología, bioquímica  
11   y características de reproducción de este género han contribuido a un mal manejo de las  
12   poblaciones naturales, por lo cual, es de gran importancia aportar información básica para  
13   mejorar el manipulación de la especie. En el caso del género *Dasyilirion* no existen reportes  
14   sobre las características bioquímicas o fisiológicas de las plantas, es decir, se carece de  
15   información básica que en cierto momento pudiera adquirir importancia práctica para la  
16   implementación y el manejo de viveros que contribuyan a la conservación de las especies  
17   de este género. La evaluación de la composición hormonal es fundamental debido a las  
18   funciones que cumplen en la planta, como la formación, desarrollo y especificación de  
19   órganos, aportación de resistencia frente a cambios climatológicos o infecciones  
20   patológicas, entre otras (Santner *et al.*, 2009).

21           Dentro de las fitohormonas más estudiadas se encuentran las giberelinas y  
22   citocininas. Las giberelinas es un grupo amplio de moléculas que pertenecen a la familia  
23   de los diterpenoides tetracíclicos, dentro de las giberelinas con mayor actividad biológica  
24   se encuentran la GA1, GA3, GA4 y GA7, las cuales juegan un papel en diversos procesos  
25   del crecimiento de las plantas que incluyen, desarrollo de la semilla, elongación de los  
26   órganos, y control del tiempo de la floración (Yamaguchi, 2008; Santner *et al.*, 2009). Por  
27   otro lado, las citocininas son fitohormonas móviles que desempeñan un papel crítico en el  
28   crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la regulación de la senescencia de la hoja

1 (Kim et al, 2006), la dominancia apical (Tanaka et al, 2006), la proliferación de la raíz  
2 (Werner et al., 2001), filotaxis (Giulini et al., 2004), la competencia reproductiva (Ashikari  
3 et al., 2005) y la señalización nutricional (Takei et al., 2002). Dentro de las citocininas  
4 bioactivas se encuentran la trans zeatina (Z) y la trans zeatina ribósido (tZR) (Neuberg *et*  
5 *al.*, 2011).

6 La determinación del contenido de Giberelina A4 (GA4) y trans zeatina ribósido  
7 (tZR) en diferentes órganos de plantas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum* puede  
8 contribuir al conocimiento de la composición bioquímica y fisiología hormonal de la  
9 especie, considerando la gran importancia que tienen las giberelinas y citocininas en la  
10 formación, desarrollo y diferenciación.

11 La evaluación de los niveles de giberelina A4 (GA4) y trans zeatina ribósido (tZR)  
12 se realizó en los meses de abril y mayo del 2013 en hojas, corona e inflorescencia de plantas  
13 adultas con flores pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum*, las cuales fueron colectadas  
14 en la región de General Cepeda, Coahuila, México en las coordenadas 25°18'43.5" latitud  
15 N, 101°45'26.5" longitud O, a una altura de 1986 ± 15.63 msnm. La región cuenta una  
16 precipitación promedio anual 300 a 400 mm, una temperatura media anual de 18 a 20 °C y  
17 un clima semiárido (BSh) según la clasificación de Köppen. El muestreo de las hojas,  
18 corona e inflorescencia se realizó bajo un esquema de muestreo sistemático en donde las  
19 plantas seleccionadas cumplieron con la característica de poseer una inflorescencia que  
20 iniciaba la emergencia. El muestreo de estos órganos se realizó en cuatro plantas pistiladas  
21 y cuatro plantas estaminadas, mismas que fueron muestreadas repetidamente una vez por  
22 semana desde el inicio de la aparición de la inflorescencia hasta que éste se secó  
23 completamente, transcurridas cinco semanas después de la emergencia de la inflorescencia.  
24 Para minimizar el daño en la planta, las muestras de tejido fueron obtenidas con ayuda de  
25 un sacabocados que colectaba de 2 a 5 gramos de tejido fresco de la corona e inflorescencia,  
26 teniendo cuidado de que la muestra no sobrepasara más de una tercera parte del diámetro  
27 de la inflorescencia. En el caso de las hojas, con ayuda de una navaja fueron cortadas desde  
28 la base dos de las hojas más jóvenes con desarrollo completo que estuvieran cercanas al

1 sitio de la emergencia de la inflorescencia, las cuales fueron cortadas en trozos de 2 cm  
2 para posteriormente ser almacenadas. Cada muestra obtenida fue colocada en su respectivo  
3 recipiente de plástico previamente etiquetado e inmediatamente fue sumergida en nitrógeno  
4 líquido, donde permaneció hasta ser almacenada en un ultracongelador (SANYO modelo  
5 MDF-U53VA) a -80 °C. Posteriormente a cada una de las muestras se les eliminó por  
6 completo el agua mediante un liofilizador (LABCONCO Modelo 2.5 L) con un vacío de  
7 0.25 mBar y una temperatura de -40 °C. Finalmente, las muestras fueron pulverizadas en  
8 un mortero y almacenadas a temperatura ambiente en recipientes que contenían silica gel  
9 y con sellado hermético.

10           Para la extracción de GA4 y tZR se pesaron 50 mg de cada muestra dentro de un  
11 tubo para microcentrífuga y se añadió 1 mL de la solución de extracción (metanol al 20%  
12 (v/v) diluido en ácido fórmico al 0.1% (v/v)). La mezcla se sometió al vortex (GENIE 1  
13 Tocuh Mixer Modelo SI-0136) por 30 segundos y a sonicación (BRANSON Modelo  
14 1510R-DTH) por 10 min. Después las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante  
15 10 min a 4°C y trasladadas a un congelador de -20 °C para dejarse incubando durante 12  
16 h. Trascurrido este tiempo las muestras volvieron a sonicarse por 10 min, y fueron  
17 centrifugadas por segunda vez a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Finalmente, el  
18 sobrenadante obtenido fue filtrado mediante membranas de 0.45 µm de diámetro de poro  
19 y transferidas a viales para su inyección en el cromatógrafo de líquidos.

20           La identificación y cuantificación de GA4 y tZR se realizó en un cromatógrafo de  
21 líquidos (Marca VARIAN Modelo 920LC), utilizando como fases móviles ácido acético a  
22 una concentración de 100 mM (Fase A) y acetonitrilo al 100% (Fase B). La determinación  
23 de GA4 se realizó con una columna C18 (POLARIS 5 C18-A, 250 mm x 4.5 mm, 5 µm),  
24 utilizando proporciones de fase 50:50 (v/v) (Fase A:B) y un flujo isocrático de 0.8 mL/min.  
25 Para la cuantificación de tZR se utilizó una columna C18 (AQUASIL C18, 250 mm x 4.6  
26 mm, 5 µm), con proporciones de fase de 80:20 (v/v) (Fase A:B) y un flujo isocrático de 0.3  
27 mL/min. El volumen de inyección del extracto vegetal para ambas determinaciones fue de

1 50  $\mu$ L. La detección de la molécula de GA4 se realizó a 205 nm, mientras que tZR se  
2 detectó a 268 nm.

3 El tiempo de retención de la GA4 fue de  $7.8 \pm 0.2$  min y el de tZR fue de  $15.4 \pm 0.25$   
4 min. Para la conversión de unidades de absorbancia a ppm se realizan curvas patrón con  
5 soluciones estándar de GA4 y tZR (Marca SIGMA). Los resultados de los cromatogramas  
6 obtenidos fueron evaluados mediante el software Galaxie Versión 1.9.302.530 (Marca  
7 VARIAN).

8 Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA con mediciones repetidas para el  
9 análisis estadístico de los datos de la cuantificación de GA4 y tZR. La prueba de diferencia  
10 mínima significativa (DMS) fue utilizada para la comparación de medias de las variables  
11 que mostraron una significancia en la prueba de F del ANOVA con un nivel de  
12 significancia estadística de  $\alpha \leq 0.05$ . Los paquetes estadísticos usados fueron el INFOSTAT  
13 Versión 2014 y el IBM SPSS Statistics Versión 22.

14 Los resultados de la prueba de DMS (Cuadro 1) mostraron una diferencia  
15 estadística ( $p \leq 0.05$ ) solo entre los órganos de plantas del mismo sexo, destacando el valor  
16 más alto de GA4 en las muestras obtenidas a partir de hojas, mientras los valores más altos  
17 de tZR se encontraron en la corona de plantas de ambos sexos y en las hojas de plantas  
18 estaminadas.

19 No se observó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en las concentraciones de GA4 y  
20 tZR al comparar entre un mismo órgano de una planta pistilada y una estaminada.

21 La prueba de DMS evidenció una diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) entre plantas de  
22 diferente sexo al analizar el promedio global de GA4, denotándose la mayor concentración  
23 de esta fitohormona en plantas estaminadas (Cuadro 2).

24 Para los valores globales de tZR no se observaron diferencias entre sexo. Por tal  
25 razón, las diferencias globales de GA4 encontradas entre las plantas pistiladas y  
26 estaminadas de *D. cedrosanum* se consideran relevantes ya que pueden constituir un punto  
27 de partida para posteriores estudios que permitan distinguir el sexo de la plantas en etapas  
28 tempranas de su crecimiento.

**Cuadro 1. Promedios de las concentraciones de GA4 y tZR en tres órganos de plantas estaminadas y pistiladas de *D. cedrosanum*.**

Sexo	Órgano	GA4 (mg/g ps)	tZr (mg/g ps)
Pistilada	Inflorescencia	0.02 ± 0.00 c	0.06 ± 0.00 c
Estaminada	Inflorescencia	0.07 ± 0.04 bc	0.06 ± 0.01 c
Pistilada	Hoja	0.10 ± 0.02 ab	0.07 ± 0.01 bc
Estaminada	Hoja	0.15 ± 0.03 a	0.09 ± 0.01 ab
Pistilada	Corona	0.02 ± 0.00 c	0.09 ± 0.01 a
Estaminada	Corona	0.05 ± 0.02 bc	0.10 ± 0.00 a

Las medias de una misma columna seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes por la prueba de DMS de Fisher a un nivel de significancia de  $\alpha \leq 0.05$ .

mg/g ps = indica los mg de GA4 o tZR encontrados en 1 g de peso seco del órgano correspondiente.

**Cuadro 2. Promedios de las concentraciones de GA4 y tZR en plantas estaminadas y pistiladas de *D. cedrosanum*.**

Sexo	GA4 (mg/g ps)	tZr (mg/g ps)
Pistilada	0.05 ± 0.01 b	0.07 ± 0.00 a
Estaminada	0.09 ± 0.02 a	0.08 ± 0.01 a

Las medias de una misma columna seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes por la prueba de DMS de Fisher a un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

mg/g ps = Indica los mg de GA4 o tZR encontrados en 1 g de peso seco del órgano correspondiente.

1            Los resultados obtenidos son diferentes a los reportados por Zanewich (1993),  
2        quién encontró que los mayores niveles de giberelina A1 (GA1), giberelina A19 (GA19) y  
3        giberelina A20 (GA20) en los brotes de *Brassica napus* con una edad de 28 días (valores  
4        entre 10 y 20 ng/g de peso seco). Una menor concentración de las tres giberelinas se  
5        encontró en los tallos medios, el hipocotiledón, y finalmente, las raíces, estas últimas con  
6        los niveles más bajos de GA1, GA19 y GA20 (valores por debajo de los 2.5 ng/g de peso  
7        seco). El mismo autor en un muestreo realizado a los 64 días analizó otros órganos, tales  
8        como, los tallos de las inflorescencias, el tallo, las hojas, las raíces y las flores; encontrando  
9        los niveles más altos en las flores (valores entre 3 y 6 ng/g de pesos seco), seguido de las  
10      hojas, los tallos y los tallos de las inflorescencias, mientras los contenidos más bajos se  
11      cuantificaron en las raíces (valores por debajo de 1ng/ g de peso seco). Los valores de  
12      giberelina encontrados en los diferentes órganos de *Dasyilirion cedrosanum* son mayores a  
13      los reportados para *Brassica napus*, ya que podemos encontrar valores desde 20,000 ng/g  
14      ps (0.02 mg/g ps en inflorescencias de plantas pistiladas) hasta los 150,000 ng/g ps (0.15  
15      mg/g ps hojas de plantas estaminadas).

16           Por otro lado, Battal y Tileklioglu, (2001) evaluaron el contenido de citocininas en  
17      plantas de *Zea mays* L. sometidas a diferentes medios de crecimiento, en las cuales  
18      observaron que la mayor concentración de zeatina ribósido se encontraba en los tallos (5.72  
19      µg/g pf a 7.67 µg/g pf), seguida de las hojas (3.30 µg/g pf a 4.98 µg/g pf) y finalmente, en  
20      las flores femeninas (1.55 µg/g pf a 2.20 µg/g pf), comportamiento que fue similar en todos  
21      los tratamientos. Los valores de trans zeatina ribósido cuantificados en la corona 0.09 mg/g  
22      ps y 0.10 mg/g ps (equivalentes a 90 µg/g ps y 100 µg/g ps), hojas 0.10 mg/g ps  
23      (equivalentes a 100 µg/g ps y 150 µg/g ps) e inflorescencias pistiladas y estaminadas  
24      60mg/g ps (equivalentes a 60 µg/g ps, en ambos casos) de *D. cedrosanum* fueron mayores  
25      a los reportados para *Zea mays* L. en órganos similares. Es importante señalar que aunque  
26      las concentraciones de GA4 y tZR en los diferentes órganos de *D. cedrosanum* son mayores  
27      a las encontradas en órganos similares de otras especies hay una tendencia similar entre  
28      especies en la acumulación de las fitohormonas en los diferentes órganos.

## 1     **CONCLUSIONES**

2

3             La mayor concentración de GA4 y tZR en *Dasyilirion cedrosanum* se encontró en  
4     las hojas y la corona, respectivamente, sin observarse alguna diferencia entre plantas  
5     estaminadas y pistiladas. Los promedios globales de estas hormonas mostraron que  
6     solamente los niveles de GA4 fueron diferentes entre sexos. Las diferencias en la  
7     concentración de GA4 encontradas en un mismo órgano de plantas de diferente sexo  
8     constituyen un punto de partida para estudios posteriores enfocados a detectar el sexo de  
9     las plantas de *Dasyilirion cedrosanum* en etapas tempranas de su crecimiento. Así mismo,  
10    las diferencias hormonales entre los distintos órganos analizados son aportaciones básicas  
11    para determinar el órgano de muestreo al realizar un monitoreo hormonal de algunas de las  
12    dos especies hormonales estudiadas en el presente trabajo (GA4 y tZR).

13

## 14    **AGRADECIMIENTOS**

15

16    Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico  
17    prestado por medio del proyecto 154682 “Análisis comparativo de caracteres genéticos y  
18    fisiológicos hipotéticamente relacionados con la determinación sexual en sotol (*Dasyilirion*  
19    *cedrosanum*)”.

20

## 21    **LITERATURA CITADA**

22

- 23    APG III. 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders  
24             and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161:105-121.
- 25    Ashikari, M.; Sakakibara, H.; Lin, S.; Yamamoto, T.; Takashi, T.; Nishimura, A.; Angeles,  
26             E.R.; Qian, Q.; Kitano, H. and Matsuoka, M. 2005. Cytokinin oxidase regulates  
27             rice grain production. Science 309:741-745.

1 Battal, P. and Tileklioglu B. 2001. The Effects of Different Mineral Nutrients on the levels  
2 of Cytokinins in Maize (*Zea mays* L.). Turk. J. Bot. 25:123-130.

3 De La Garza, H.T.; Martínez, M.; Lara, L.; Rodríguez, R.H.; Rodríguez, J.M. and Aguilar,  
4 C.N. 2008. Production of a mexican alcoholic beverage: sotol. Res. J. Biol. Sci.  
5 3(6):566-571.

6 Giulini, A.; Wang, J. and Jackson, D. 2004. Control of phyllotaxy by the cytokinin-  
7 inducible response regulator homologue ABPHYL1. Nature 430:1031-1034.

8 Kim, H.J.; Ryu, H.; Hong, S.H.; Woo, H.R.; Lim, P.O.; Lee, I.C.; Sheen, J.; Nam, H.G. and  
9 Hwang, I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through  
10 phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. Proceedings of National Academy of  
11 Sciences, USA. 103:814-819.

12 Martorell, C. and Ezcurra E. 2002. Rosette scrub occurrence and fog availability in arid  
13 mountains of Mexico. J. Veg. Sci. 13:651-662.

14 Neuberg, L.M.; Pavlíková, D.; Žižková, E.; Motyka, V. and Pavlík, M. 2011. Different  
15 types of N nutrition and their impact on endogenous cytokinin levels in *Festulolium*  
16 and *Trifolium pretense* L. Plant Soil Environ. 57(8): 381-387.

17 NORMA OFICIAL MEXICANA. 2004. (NOM-159-SCFI-2004). Bebidas alcohólicas-  
18 sotol-especificaciones y métodos de prueba.

19 Santner, A.; Calderon, V.L.I.A. and Estelle M. 2009. Plant hormones are versatile chemical  
20 regulators of plant growth. Nat. Chem. Biol. 5(5):301-307.

21 Takei, K.; Takahashi, T.; Sugiyama, T.; Yamaya, T. and Sakakibara, H. 2002. Multiple  
22 routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal  
23 transduction pathway mediated by cytokinin. J. Exp. Bot. 53:971-977.

24 Tanaka, M.; Takei, K.; Kojima, M.; Sakakibara, H. and Mori, H. 2006. Auxin controls local  
25 cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. Plant J. 45:1028-  
26 1036.



- 1 Werner, T.; Motyka, V.; Strnad, M. and Schmülling T. 2001. Regulation of plant growth  
2 by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 98:10487-  
3 10492.
- 4 Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*  
5 59:225-251.
- 6 Zanewich, K.P. 1993. Vernalization and Gibberellin Physiology of Winter Canola. Tesis  
7 de Maestría en Ciencias. Universidad de Lethbridge. Lethbridge, Alberta, Canadá.  
8 43-46 p.  
9

# GA4 AND tZR QUANTIFICATION IN PISTILLATE AND STAMINATE PLANTS OF *DASYLIRION CEDROSANUM*

## HORMONAL QUANTIFICATION IN *DASYLIRION CEDROSANUM*

ERIKA NOHEMI RIVAS MARTÍNEZ<sup>1</sup>, RAHIM FOROUGHBAKCHK POURNAVAB<sup>1</sup>,  
MANUEL HUMBERTO REYES VALDÉS<sup>2</sup>, ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Botánica, Av. Pedro de Alba, s/n, cruz con Av. Manuel L. Barragán, CP. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro, #1923, Col. Buenavista CP. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Col. Buenavista CP. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

\*Autor de Correspondencia: A Benavides-Mendoza, e-mail:abenmen@gmail.com.

### Abstract

‘Sotol’, a protected designation of origin alcoholic beverage, is obtained from *Dasyilirion cedrosanum* plants. There is little knowledge concerning the sexual differentiation mechanisms of this species, which leads to a lack of proposals for not only its conservation and reforestation but also mechanisms to account for the dioecious nature of the plant. Phytohormones have been associated with sexual differentiation in dioecious plants because, individually or in combination, these hormones promote masculinization or feminization of their sexual structures. The objective of this study was to quantify gibberellin A4 (GA4) and trans-zeatin riboside (tZR) levels in samples of different organs of staminate and pistillate plants of *D. cedrosanum*, which were collected at different stages of floral development. The plant material was obtained at three locations in Coahuila at North Mexico. Gibberellin A4 (GA4) and trans-zeatin riboside (tZR) were quantified by HPLC-UV at 205nm and 268nm, respectively. During the later appearance of pollen and seeds, the GA4 levels in the crown and leaves were the same but exceeded those in the inflorescence. There were no differences in tZR levels between the plants of different sexes. Among organs, differences were only found during inflorescence emergence and death, stages during which the crown presented the highest levels of tZR. The results for the GA4/tZR ratio were similar to those reported for GA4. GA4 most likely plays a role in sexual determination in *D. cedrosanum* because its presence is associated with the appearance of staminate flowers.

**Key words:** Phytohormones, sotol, cytokinins, gibberellins, sexual differentiation

## INTRODUCTION

Most flowering plants in the world are hermaphroditic. However, a minority of self-pollinating flowering plants evolved toward two different sexual forms, that is, toward dioecy. Approximately three-quarters of the flowering plant families include dioecious plant species. Dioecy occurs in the *Asparagaceae* family but is not especially prevalent (Ainsworth, 2000).

*Dasyilirion cedrosanum* is a dioecious plant belonging to the *Asparagaceae* family, Nolinaceae subfamily. This subfamily is distributed in Northern Mexico and the Southwestern United States at elevations of 950-2000 meters above sea level (masl) (Bogler, 1994). Certain species of the genus, such as *D. duranguense*, *D. wheeleri*, and *D. cedrosanum*, have economic significance because they are used regardless of their sex to obtain extracts with high sugar content. Those extracts are obtained from ground, boiled, and fermented crown tissues and are used to create an alcoholic beverage common in regions where the plant grows (De la Garza, 2008). Local populations refer to this beverage by several names, such as “sotol,” “zotol,” or “sereque.” In 2002, “Sotol,” as it is known in Mexico (SCFI, 2004), obtained a protected designation of origin. For the inhabitants of the arid regions where different species of *Dasyilirion* are found, the artisanal production of the sotol beverage is one of the most significant sources of income. Nevertheless, little information concerning the biology of these plants is available, especially concerning their reproductive characteristics. This lack of knowledge has contributed to the poor management of natural populations and an overexploitation of this natural resource. This overexploitation could be alleviated by establishing nursery specimens of *D. cedrosanum* to be used in reforestation programs. However, this activity requires techniques for the early determination of the sex of plants. Unfortunately, there is currently no information on this topic because of a poor understanding of the factors involved in sex determination in the *Dasyilirion* genus.

Certain determinants of sexual differentiation in dioecious plants are based upon the presence of sex-linked genes, homomorphic X and Y chromosomes, or the presence of compounds such as phytohormones that induce the masculinization or feminization of sex organs (Durnad & Durnad, 1984; Ming *et al.*, 2007; Soldatova & Khryanin, 2010). Gibberellins and cytokinins are among the phytohormones that play a key role in sexual differentiation because these hormones induce masculinization and feminization, respectively, in different species, such as *Cucumis sativus* (Yin & Quinn, 1995b), *Mercurialis annua* (Boissay *et al.*, 1996), *Zea mays* L. (Zhao *et al.*, 1999), *Buchloe*

*dactyloides* (Yin & Quinn, 1995a), and *Cannabis sativa* L. (Soldatova & Khryanin, 2010). However, note that sex organ masculinization or feminization is not always induced by these hormones. For example, sex determination in male and female asparagus (*Asparagus officinalis*) flowers depends on endogenous levels of auxin and cytokinins, respectively (Bracale *et al.*, 1991).

According to the above studies, sex determination in many species showing either monoecy or dioecy is believed to be driven by more than one of the genetic or biochemical mechanisms mentioned above (Soldatova & Khryanin, 2010).

Because studies on sex determination are unavailable for sotol and would provide information of great practical use for improving plant fitness, nursery management, and species conservation, the objective of the present study was to determine the effect of gibberellin A4 (GA4), trans-zeatin riboside (tZR), and the GA4/tZR ratio on sex determination in *D. cedrosanum*.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample collection, processing, and storage.** The analysis of GA4 and tZR levels was conducted in leaf, crown, and inflorescence stem from adult pistillate (female) and staminate (male) plants of *D. cedrosanum*. The plants were sampled at three locations in Mexico: San Lorenzo Canyon (SLC) (Canyon de San Lorenzo) and Antonio Narro Autonomous Agrarian University (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro - UAAAN), both in Saltillo municipality, Coahuila, and one location in General Cepeda municipality (GC), Coahuila. The sampling of crown, leaves, and inflorescence was performed using a systematic sampling method on plants with a recently emerged floral inflorescence. The sampling of these organs was performed on four pistillate and four staminate plants, with the same plants sampled repeatedly once a week from the time of inflorescence appearance until the inflorescence was completely dried, providing a total of four consecutive samplings. Samplings 1, 2, 3, and 4 refer to different stages: inflorescence emergence, flower appearance, pollen and seed appearance, and inflorescence death, respectively. To minimize damage to the plants, the tissue samples were obtained using a borer, collecting 2-5 g of fresh tissue from the crown and inflorescence. Care was taken to ensure that the samples were no larger than one-third of the inflorescence diameter. The leaf samples were taken from the base of the two youngest, fully developed leaves near the location of inflorescence emergence. The samples were cut into 2 cm pieces for storage. Each sample was placed in a labeled

plastic container and immediately immersed in liquid nitrogen until storage at -80 °C in an ultrafreezer (SANYO model MDF-U53VA). After 12 h of freezing, the water in the samples was completely removed using a lyophilizer (LABCONCO Model 2.5L) with a 0.25 mbar vacuum at -40 °C. Finally, the samples were pulverized in a mortar and stored at room temperature in containers with silica gel and hermetic seals.

**Gibberellin A4 and tZR extraction.** A 50 mg portion of each sample was placed in a microtube, and 1 mL of extraction solution [20% (v/v) methanol diluted in 0.1% (v/v) formic acid] was added. The samples were vortexed (Vortex-Genie 1 Touch Mixer, model SI-0136) for 30 s and sonicated (BRANSON model 1510R-DTH sonicator) for 10 min. The samples were then centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C and incubated for 12 h in a freezer at -20 °C. After the 12 h incubation, a second sonication was performed for 10 min, followed by centrifugation for 10 min at 12,000 rpm at 4 °C. Finally, the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m pore diameter membrane and transferred to vials to be injected into a liquid chromatograph.

**Gibberellin A4 determination by high-performance liquid chromatography (HPLC).** The identification and quantification of GA4 were conducted using a high-performance liquid chromatograph (VARIAN model 920LC) with a UV detector. The separation and identification of GA4 were performed at room temperature using a POLARIS 5 C18-A column with the following dimensions: 250 mm length, 4.5 mm internal diameter, and 5  $\mu$ m particle size (VARIAN brand). The mobile phases, containing 100 mM acetic acid and 100% acetonitrile mixed 50:50 (v/v), were used in isocratic mode at 0.8 mL/min flux. The plant extract injection volume was 50  $\mu$ L, and molecule detection was monitored at 205 nm. The hormone levels were quantified by reference to a calibration curve prepared from a serial dilution of 90% pure GA4 (SIGMA). The GA4 retention time was  $7.8 \pm 0.2$  min. The results were analyzed with Galaxie software, version 1.9.302.530 (VARIAN).

**Determination of tZR by HPLC.** The determination and quantification of tZR were performed using a high-performance liquid chromatograph (VARIAN Model 920LC) with a UV detector. The tZR separation and identification were performed at room temperature using an AQUASIL C18 column with the following dimensions: 250 mm length, 4.6 mm internal diameter, and 5  $\mu$ m particle size (THERMO

SCIENTIFIC). The mobile phases, containing 100 mM acetic acid and 100% acetonitrile mixed 80:20 (v/v), were used in isocratic mode at 0.3 mL/min flux. The plant extract injection volume was 50  $\mu$ L, and molecule detection was monitored at 268 nm. To quantify hormone levels, a calibration curve was implemented by using 95% pure tZR (SIGMA) to generate different concentrations. The tZR retention time was  $15.4 \pm 0.25$  min. The chromatography results were analyzed with Galaxie software, version 1.9.302.530 (VARIAN).

**GA4/tZR ratio estimation.** The GA4/tZR ratio was the quotient obtained by dividing the GA4 concentration by that of tZR, with both concentrations obtained in the same plant organ collected during the same sampling.

**Statistical analysis.** The GA4 and tZR results and phytohormone ratio (GA4/tZR) data were evaluated using repeated measures ANOVA ( $\alpha \leq 0.05$ ). This procedure was followed by Fisher's least significant difference (LSD) test ( $\alpha \leq 0.05$ ) to compare the means that showed statistical significance in the ANOVA. The statistical tests were performed using Statistica software, version 7.0.n.

## RESULTS

The repeated measures ANOVAs for the GA4 content, tZR content, and GA4/tZR ratio (Tables 1, 2 and 3) showed significant differences for the sex, organ, and location factors and for the interaction of these three factors, except that for the tZR content, no significant difference was recorded for sex or for the interaction among the three factors.

**GA4 levels in different organs from pistillate and staminate *D. cedrosanum* plants located at three locations in Coahuila, Mexico.** The content of GA4 was higher in the leaves than in the other evaluated organs during stages 1 and 2 (Table 1). The difference disappeared by stage 3, during which the levels of hormone were statistically identical in the leaves and crown but higher than in the inflorescence. By stage 4, the GA4 levels were similar in the three organs. The differences in GA4 content among the organs may indicate flowering induction signals because a higher GA4 content in staminate plants was found during stages 2 and 3 after inflorescence emergence. Regarding the effect of the location factor

on GA4 content, the data show that the plants in GC had the lowest levels for this hormone over the four stages.

**The concentration of tZR in different organs from pistillate and staminate *D. cedrosanum* plants located at three locations in Coahuila, Mexico.** The tZR content varied among the three organs during the first week of inflorescence emergence (Table 2). There was a noticeable difference in tZR levels, with crown > leaves > inflorescence. The occurrence of a difference disappeared during stages 2 and 3 but reappeared during stage 4, with crown = inflorescence > leaves. This pattern could be related to the signaling associated with flowering induction, without differences in the plant tZR levels attributable to sex. Differences in tZR concentrations among the locations were only noted during stage 1, with higher hormone content in the plant samples from GC and UAAAN than in those from SLC.

**GA4/tZR ratio determination in different organs from pistillate and staminate *D. cedrosanum* plants in three locations of Coahuila, Mexico.** Differences in the GA4/tZR ratio were found between the sexes during stages 2 and 3 after inflorescence emergence, in similarity with the differences found for the GA4 levels. The staminate plants showed a higher GA4/tZR ratio (Table 3) than that shown by the pistillate plants. When analyzing the different organs, the GA4/tZR ratio was observed to vary during inflorescence development, with leaves = inflorescence > crown at stage 1, leaves > inflorescence = crown during the second sampling, leaves = crown > inflorescence during the third sampling, and finally crown = leaves = inflorescence at stage 4. For the GA4/tZR ratio compared among the locations, the results showed that during most stages, with the exception of the second sampling stage, the highest levels were found in the plants at SLC and UAAAN.

**Analysis of the interaction among sex, organ, and location factors for the GA4 and tZR contents and the GA4/tZR ratio.** The effect of the location, organ, and sex interaction showed that at UAAAN, higher GA4 levels were found in the leaves of staminate plants during stages 1, 2, and 3. However, in SLC, higher GA4 levels were obtained from the crown of staminate plants at stages 3 and 4. Finally, in GC, higher GA4 levels were present in the inflorescence of pistillate plants during stage 4 of inflorescence development (Fig. 1).

Figure 2 shows that the highest tZR values were found in the inflorescence tissue of staminate plants during stages 2 and 4 at UAAAN. Comparing organs, the highest tZR content was observed in the crown during stages 1 and 4 of inflorescence development, showing no differences between the sexes. In GC, the highest levels of this hormone were found in the crown of staminate and pistillate plants at stage 4 of inflorescence development. Finally, in SLC, the tZR concentration was high in the inflorescence tissues of pistillate plants at stages 2, 3, and 4. The leaves were the organ showing the lowest tZR levels in all the cases.

Finally, the highest GA4/tZR ratio was found in the leaves collected from the staminate plants at UAAAN during stages 1, 2, and 3, whereas in SLC, the GA4/tZR ratio was higher in the crown of staminate plants sampled at stages 3 and 4. Still, one can observe that both the staminate and pistillate plants showed the lowest GA4/tZR ratio in GC compared with SLC and UAAAN (Fig. 3).

## DISCUSSION

**GA4 and tZR concentrations in organs of pistillate and staminate *D. cedrosanum* plants located at three sites in Coahuila, Mexico.** The values in Table 1 indicate that only the GA4 levels differed in plants of different sex and did so at stages 2 and 3 after inflorescence emergence. This result also affected the GA4/tZR ratio, which showed the highest values at the same stages. Similar results were reported by Pimenta *et al.* (2012), who analyzed endogenous levels of 7 gibberellins (GA4, GA9, GA12, GA15, GA24, GA34, and GA51) at five stages of stamen development in male flowers of *Cucurbita maxima* L. plants. Their objective was to determine whether a relationship exists between gibberellins and the appearance of traits specific to male flowers. The results presented by these authors showed higher gibberellin levels in stamens compared with other tissues of the male flowers. In addition, the GA4 levels were higher in the stamens and other components of the male flowers after development stage 3. However, there was a generalized increase of most gibberellins in the tissues of the staminate flowers; thus, the authors pointed to gibberellins as essential for male flower development in *Cucurbita maxima*.

The effects of gibberellins and cytokinins on masculinization and feminization have also been previously reported for *Cannabis sativa*. The germination of seeds in a Pb(NO<sub>3</sub>)-enriched medium led to an increase in endogenous gibberellin levels in these plants and an increased appearance of staminate



plants. By contrast, the plants obtained from seeds germinated in a nutritive medium supplemented with CuSO<sub>4</sub> and ZnSO<sub>4</sub> showed an increase of zeatin levels, resulting in an increased frequency of pistillate plants (Soldatova & Khryanin, 2010).

Menéndez *et al.* (2006) stated that gibberellins (GAs) play a role in determining the sex of gametophytes in the fern *Blechnum spicant* L. The authors quantified the endogenous levels of GA1, GA3, GA4, GA7, GA9, and GA20 in both male and female gametophytes, producing results showing that endogenous levels of gibberellin are not significantly different between the sexes. However, the GA4, GA7, and GA20 levels were higher than those of GA1, GA3, and GA9.

In certain species such as *Chara vulgaris*, gibberellins promote the development of male sex organs, as in some ferns. However, in monocots such as corn, these hormones induce plant feminization (Vandenbussche *et al.*, 2007).

The masculinizing effect of gibberellins in certain species may be explained by the results of previous studies that pinpoint the role of gibberellins in pollen viability and pollen tube development in staminate *Arabidopsis* and rice plants (Singh *et al.*, 2002; Chhun *et al.*, 2007). Furthermore, it is known that gibberellins play an important role during certain stages of plant development, such as the control of flowering time (Ouzounidou *et al.*, 2011).

However, certain research contradicts the feminizing effect of cytokinins: Louis *et al.* (1990) reported that trans-zeatin (tZ) is related to genes responsible for feminization in *M. annua*, whereas tZR, its precursor, has been identified as an inducer of masculinization in the same species.

A number of studies show masculinization and feminization induced by gibberellins and cytokinins in plants such as *Cucumis sativus*, *M. annua*, *Z. mays*, and *B. dactyloides* (Yin & Quinn, 1995a, 1995b; Boissay *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1999). Nevertheless, this behavior is not common, as other studies show that sexual differentiation in plants is associated with other phytohormones, such as ethylene, indole acetic acid (IAA), abscisic acid, isopentenyladenosine, and dihydrozeatin riboside (Hamdi *et al.*, 1987; Marziani *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 2009). All of them play an important role in sexual differentiation in plants such as asparagus (*A. officinalis*), which belongs to the *Asparagaceae* family, as does *D. cedrosanum*. In the *Asparagaceae* family, a greater concentration of abscisic acid has been observed in young staminate flowers than in young pistillate flowers (Marziani *et al.*, 1990).

A study by Trebitsh *et al.* (1997) demonstrated that cucumber plants treated with a high concentration of auxins and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC, an ethylene precursor) produced pistillate flowers and reduced the production of staminate flowers.

As in the above reports, we may deduce from the present results that in the case of *D. cedrosanum*, a gibberellin (GA4) plays a significant role in the appearance of staminate flowers. The tZR hormone concentrations, however, showed no differences between the plants of different sexes.

**GA4/tZR ratio from pistillate and staminate *D. cedrosanum* plants located at three locations in Coahuila, Mexico.** There are no reports regarding the specific GA4/tZR ratio needed to induce feminization or masculinization of plant sex organs. However, certain studies show that the relative concentration of hormones may be associated with sexual differentiation. An example of this effect can be seen in the study by Stokes *et al.* (2003), who quantified the levels of different gibberellins (GA18, GA19, GA29, and GA53) in young inflorescences of both sexes of *Rumex acetosa* L. The authors observed higher GA18 and GA29 levels in staminate plants ( $386.4 \pm 48.8$  and  $363.9 \pm 57.1$  pmol/g dry weight, respectively) compared with pistillate plants ( $141.6 \pm 27.2$  and  $163.3 \pm 27.7$  pmol/g dry weight, respectively). However, higher GA19 and GA53 concentrations were present in pistillate plants ( $538.5 \pm 92.4$  and  $228.8 \pm 22.0$  pmol/g dry weight, respectively) than in staminate plants ( $278.3 \pm 51.2$  and  $156.4 \pm 23.1$  pmol/g dry weight, respectively).

Liu *et al.* (2008) deduced that an increase in the relative content of tZ/IAA and GA3/tZ induces feminization of *Benincasa hispida* Cogn var. Chiehqua plants. In addition, a higher GA3 content in stem apexes leads to the development of female flowers in this species.

In accordance with the report by Khryanin (2007) it should be mentioned that sex organ differentiation in plants is influenced by genetic, biochemical, and environmental factors. Thus, sex determination in many monoecious and dioecious species is most likely dependent on more than one of the aforementioned factors. For hormones, it would be advisable to broaden the studies distinguishing pistillate and staminate plants to assess other phytohormones together with GA4 and tZR, including gibberellin and cytokinin isomers and conjugates, as well as to individually evaluate additional phytohormones, such as auxins, abscisic acid, and ethylene (Kumar *et al.*, 2009). Furthermore, a possible relationship between the ratios of these phytohormones should be considered (Soldatova *et al.*, 2008).

**Analysis of the interaction of sex, organ, and location factors on GA4 and tZR content and GA4/tZR ratio.** The results for the interactions among the three factors (sex, organ, and location) on the quantified hormones (GA4, tZR, and GA4/tZR ratio) showed the lowest GA4 levels for the GC location, a pattern subsequently reflected in the hormonal ratio. We are not certain why different GA4 and tZR levels were seen among the organs and stages at the different locations. One might propose that the effect of the hormones on flower induction was modified by other factors, such as irradiance, temperature, and relative humidity (Bernier *et al.*, 1993) or soil mineral composition, as previously demonstrated by Sekimoto *et al.* (1997). These authors observed a decrease in GA1 levels in maize because of a deficiency in Zn. Foliar applications of ZnSO<sub>4</sub> increased GA3 and auxin levels in *Z. mays* plants (Tohidi *et al.*, 2013). Similarly, Battal and Tıleklioğlu (2001) analyzed the effect of sufficient, deficient, and excessive concentrations of N, P, K, Ca, Mg, S, and Fe on tZ and tZR levels in the roots, stems, leaves, flowers, and fruits of *Z. mays* plants. The authors observed the highest tZ levels in the roots of plants treated with excess P, in the stems and female flowers of plants treated with excess K, and in the leaves and seeds of plants treated with excess Ca. The highest tZR levels, however, were observed in the roots and stems of plants treated with excess Fe and in the leaves, female flowers and seeds of plants treated with excess K.

## CONCLUSIONS

GA4 varied between the sexes and among the organs evaluated in *D. cedrosanum* plants. The staminate plants presented higher levels of GA4 when compared with the pistillate plants. The variation of GA4 levels in the different organs during the stages of the sex organ development indicates a possible association of GA4 with flower induction. The tZR levels quantified in the different plant organs showed significant differences only during stages 1 and 4, which both displayed the highest level of tZR in crown tissue. The GA4/tZR ratio varied significantly between the sexes during stages 3 and 4 of inflorescence development, with the highest levels in staminate plants. For tZR, there was no significant effect of sex, even when the plants presented sex-specific morphological characteristics. The lowest GA4 levels were quantified in the staminate and pistillate plants collected from the General Cepeda location, whereas the highest levels were found in the staminate plants from SLC and UAAAN. The

hormonal differences among the locations may be due to variation in the edaphoclimatic conditions existing in each region. No differences in tZR levels were detected among the locations. The GA4/tZR ratio in the three locations reflected a similar behavior than the GA4.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT) through project 154682 “Comparative analysis of genetic and physiological characteristics hypothetically related to sex determination in sotol (*Dasyilirion cedrosanum*)”.

## REFERENCES

- Ainsworth, Ch. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Ann Bot.* 86: 211-221.
- Bernier, G., A. Havelange, C. Houssa, A. Petitjean and P. Lejeune.1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell.* 5: 1147-1155.
- Bogler, D.J. 1994. Taxonomy and Phylogeny of *Dasyilirion* (*Nolinaceae*). Ph.D. dissertation. University of Texas. *FNA.* 26(1): 413-414,422.
- Boissay, E., M. Delaigue, C. Sallaud and R. Esnault. 1996. Predominant Expression of a Peroxidase Gene in Staminate Flowers of *Mercurialis annua*. *Physiol. Plant.* 96: 251–257.
- Bracale, M., E. Caporali, M.G. Galli, C. Longo, L.G. Marziani, G. Rossi, A. Spada, C. Soave, A. Falavigna, F. Raffaldi, E. Maestri, F.M. Restivo and F. Tassi.1991. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Sci.* 80(1-2): 67-77.
- Chhun, T., K. Aya, K. Asano, E. Yamamoto, Y. Morinaka, M. Watanabe, H. Kitano, M. Ashikari, M. Matsuoka and M. Ueguchi-Tanaka. 2007. Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *Plant Cell.* 19: 3876-3888.
- De La Garza, H.T., M. Martínez, L. Lara, R.H. Rodríguez, Rodríguez, J.M. and C.N. Aguilar. 2008. Production of a Mexican Alcoholic Beverage: Sotol. *Res. J. Biol. Sci.* 3(6): 566-571.

- Durand, R. and B. Durand. 1984. Sexual differentiation in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 267-274.
- Hamdi, S., G. Teller and J.P. Louis. 1987. Master Regulatory Genes, Auxin Levels, and Sexual Organogenesis in the Dioecious Plant *Mercurialis annua*. *Plant Physiol.* 85: 393-399.
- Kumar, V., G. Parvatam and G.A. Ravishankar. 2009. AgNO<sub>3</sub> - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electron. J. Biotechn.* 12(2): 1-15.
- Liu, H., S. Song, R. Chen and G. Sun. 2008. The effect of hormones on female flower differentiation in wax. *Acta Hortic.* 1(774): 30-313.
- Louis, J.P., C. Augur and G. Teller. 1990. Cytokinins and Differentiation Processes in *Mercurialis annua*. *Plant Physiol.* 94: 1535-1541.
- Marziani, L.G.P., G. Rossi, G. Scaglione, C.P. Longo and C. Soave. 1990. Sexual differentiation in *Asparagus officinalis* L. Sex. *Plant Reprod.* 3: 236-243.
- Menéndez, V., M.A. Revilla, P. Bernard, V. Gotor and H. Fernández. 2006. Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Rep.* 25(10): 1104-1110.
- Ming, R., J. Wang, P.H. Moore and A.H. Paterson. 2007. Sex chromosomes in flowering plants. *Am. J. Bot.* 94(2): 141-150.
- Ouzounidou, G., A. Giannakoula, M. Asfi and I. Ilias. 2011. Differential responses of onion and garlic against plant growth regulators. *Pak. J. Bot.* 43(4): 2051-2057.
- Pimenta, L.M.J., N. Knop and T. Lange. 2012. Stamen derived bioactive gibberellin is essential for male flower development of *Cucurbita maxima* L. *J. Exp. Bot.* 63(7): 2681-2691.
- SCFI, 2004. (SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL). NOM-159-SCFI-2004. Bebidas alcohólicas-sotol-especificaciones y métodos de prueba. 16 de Junio del 2004. pp. 1-29
- Sekimoto, H., M. Hoshi, T. Nomura and T. Yokota. 1997. Zinc Deficiency Affects the Levels of Endogenous Gibberellins in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 38(9): 1087-1090.
- Singh, D.P., A.M. Jermakow and S.M. Swain. 2002. Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 14: 3133-3147.
- Soldatova, N.A. and V.N. Khryanin. 2010. The effects of heavy metal salts on the phytohormonal status and sex expression in marijuana. *Russ. J. Plant. Physl.* 57: 96-100.

- Tohidi, H.R.M, H. Zahedi and A. Ashkiani. 2013. Effect of zinc foliar application on auxin and gibberellin hormones and catalase and superoxide dismutase enzyme activity of corn (*Zea mays* L) under water stress. *Maydica*. 58: 218-223.
- Trebitsh, T., J.E. Staub and S.D. O'Neil. 1997. Identification of a 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene Linked to the Female (F) Locus That Enhances Female Sex Expression in Cucumber. *Plant Physiol*. 113: 987-995.
- Vandenbussche, F., A. Fierro, G. Wiedemann, R. Reski and D. Van der Straeten. 2007. Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components. *BMC Plant Biol*. 7: 65-82. doi:10.1186/1471-2229-7-65.
- Yin, T.J. and J.A. Quinn. 1995a. Test of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Buchloe dactiloides* (Poaceae). *Am. J. Bot*. 82: 745-751.
- Yin, T.J. and J.A. Quinn. 1995b. Test of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). *Am. J. Bot*. 82: 1537-1546.
- Zhao, D., Y. Han, Y. Fu, F. Guo and F. Meng. 1999. Changes of plant hormones in inflorescence during sex determination in maize. *Acta Phytophysiol. Sinica*. 25: 57-65.

## TABLES

**Table 1. Mean and standard error of GA4 concentration (mg/g dry weight) in different organs of *Dasyllirion cedrosanum* plants collected from three locations in Coahuila.**

FACTOR	STAGE			
	1	2	3	4
<b>Sex</b>				
Pi	0.0904 ± 0.02 <b>a</b>	0.1068 ± 0.02 <b>b</b>	0.1559 ± 0.03 <b>b</b>	0.2478 ± 0.05 <b>a</b>
St	0.1099 ± 0.02 <b>a</b>	0.1944 ± 0.05 <b>a</b>	0.3371 ± 0.08 <b>a</b>	0.2323 ± 0.09 <b>a</b>
<b>Organ</b>				
I	0.0580 ± 0.01 <b>b</b>	0.1066 ± 0.03 <b>b</b>	0.0684 ± 0.01 <b>b</b>	0.1673 ± 0.05 <b>a</b>
C	0.0747 ± 0.02 <b>b</b>	0.0918 ± 0.02 <b>b</b>	0.3090 ± 0.11 <b>a</b>	0.3335 ± 0.14 <b>a</b>
L	0.1678 ± 0.04 <b>a</b>	0.2534 ± 0.06 <b>a</b>	0.3621 ± 0.07 <b>a</b>	0.2193 ± 0.04 <b>a</b>
<b>Location</b>				
GC	0.0492 ± 0.02 <b>b</b>	0.0878 ± 0.03 <b>b</b>	0.0889 ± 0.02 <b>b</b>	0.0760 ± 0.03 <b>b</b>
SLC	0.0995 ± 0.02 <b>b</b>	0.1090 ± 0.01 <b>b</b>	0.3141 ± 0.10 <b>a</b>	0.3839 ± 0.13 <b>a</b>
UAAAN	0.1690 ± 0.04 <b>a</b>	0.2898 ± 0.08 <b>a</b>	0.3665 ± 0.09 <b>a</b>	0.2669 ± 0.07 <b>ab</b>
<b>Significance Wilk test</b>				
Sex (S)	P = 0.012			
Organ (O)	P < 0.01			
Location (Lc)	P < 0.01			
S x O x Lc	P = 0.002			

The data represent the mean values ± standard error. Different letter (s) corresponds to significant differences at  $p \leq 0.05$  by Fisher's LSD test. (Pi) Pistillate, (St) Stamine, (I) Inflorescence, (C) Crown, (L) Leaf, (GC) General Cepeda municipality, (SLC) San Lorenzo Canyon, (UAAAN) Antonio Narro Autonomous Agrarian University.

**Table 2. Mean and standard error of tZR concentration (mg/g dry weight) in different organs of *Dasyllirion cedrosanum* plants collected from three locations in Coahuila.**

FACTOR	STAGE			
	1	2	3	4
Sex				
Pi	0.0513 ± 0.01 a	0.0703 ± 0.01 a	0.0636 ± 0.01 a	0.0840 ± 0.01 a
St	0.0624 ± 0.01 a	0.0734 ± 0.01 a	0.0733 ± 0.01 a	0.0842 ± 0.01 a
Organ				
I	0.0398 ± 0.01 c	0.0743 ± 0.01 a	0.0647 ± 0.01 a	0.0822 ± 0.01 ab
C	0.0723 ± 0.01 a	0.0749 ± 0.01 a	0.0682 ± 0.01 a	0.0984 ± 0.01 a
L	0.0583 ± 0.01 b	0.0664 ± 0.01 a	0.0726 ± 0.01 a	0.0717 ± 0.01 b
Location				
GC	0.0695 ± 0.01 a	0.0758 ± 0.01 a	0.0681 ± 0.01 a	0.0892 ± 0.01 a
SLC	0.0375 ± 0.01 b	0.0686 ± 0.01 a	0.0705 ± 0.01 a	0.0773 ± 0.01 a
UAAAN	0.0656 ± 0.01 a	0.0709 ± 0.01 a	0.0663 ± 0.01 a	0.0864 ± 0.01 a
Significance	Wilk test			
Sex (S)	P = 0.372			
Organ (O)	P < 0.01			
Location (Lc)	P < 0.01			
S x O x Lc	P = 0.362			

The data represent the mean values ± standard error. Different letter (s) corresponds to significant differences at  $p \leq 0.05$  by Fisher's LSD test. (Pi) Pistillate, (St) Stamine, (I) Inflorescence, (C) Crown, (L) Leaf, (GC) General Cepeda municipality, (SLC) San Lorenzo Canyon, (UAAAN) Antonio Narro Autonomous Agrarian University.



**Table 3. Average values for the GA4/tZR ratio (mg/g dry weight) quantified in the leaf, crown, and inflorescence of *Dasyllirion cedrosanum* plants collected in three locations in Coahuila and analyzed during four consecutive samplings.**

FACTOR	STAGE			
	1	2	3	4
<b>Sex</b>				
Pi	2.0700 ± 0.33 <b>a</b>	1.8640 ± 0.41 <b>b</b>	2.8789 ± 0.55 <b>b</b>	3.2801 ± 0.65 <b>a</b>
St	2.3520 ± 0.57 <b>a</b>	3.0483 ± 0.69 <b>a</b>	6.0901 ± 1.65 <b>a</b>	4.2620 ± 1.96 <b>a</b>
<b>Organ</b>				
I	2.2899 ± 0.64 <b>ab</b>	1.9613 ± 0.50 <b>b</b>	1.4912 ± 0.31 <b>b</b>	2.5220 ± 0.70 <b>a</b>
C	1.2537 ± 0.26 <b>b</b>	1.3541 ± 0.23 <b>b</b>	6.2848 ± 2.27 <b>a</b>	5.2248 ± 2.95 <b>a</b>
L	3.0894 ± 0.66 <b>a</b>	4.0530 ± 1.01 <b>a</b>	5.6776 ± 1.19 <b>a</b>	3.5664 ± 0.61 <b>a</b>
<b>Location</b>				
GC	0.6383 ± 0.14 <b>b</b>	1.2511 ± 0.45 <b>b</b>	1.4947 ± 0.39 <b>b</b>	0.8611 ± 0.23 <b>b</b>
SLC	3.2179 ± 0.57 <b>a</b>	1.9978 ± 0.24 <b>b</b>	6.4121 ± 2.06 <b>a</b>	6.6702 ± 2.67 <b>a</b>
UAAAN	2.9655 ± 0.75 <b>a</b>	4.6739 ± 1.18 <b>a</b>	5.9008 ± 1.43 <b>a</b>	3.7856 ± 0.66 <b>ab</b>
<b>Significance Wilk test</b>				
Sex (S)	P = 0.007			
Organ (O)	P < 0.01			
Location (Lc)	P < 0.01			
S x O x Lc	P < 0.01			

The data represent the mean values ± standard error. Different letter (s) corresponds to significant differences at  $p \leq 0.05$  by Fisher's LSD test. (Pi) Pistillate, (St) Staminate, (I) Inflorescence, (C) Crown, (L) Leaf, (GC) General Cepeda municipality, (SLC) San Lorenzo Canyon, (UAAAN) Antonio Narro Autonomous Agrarian University.

## FIGURES

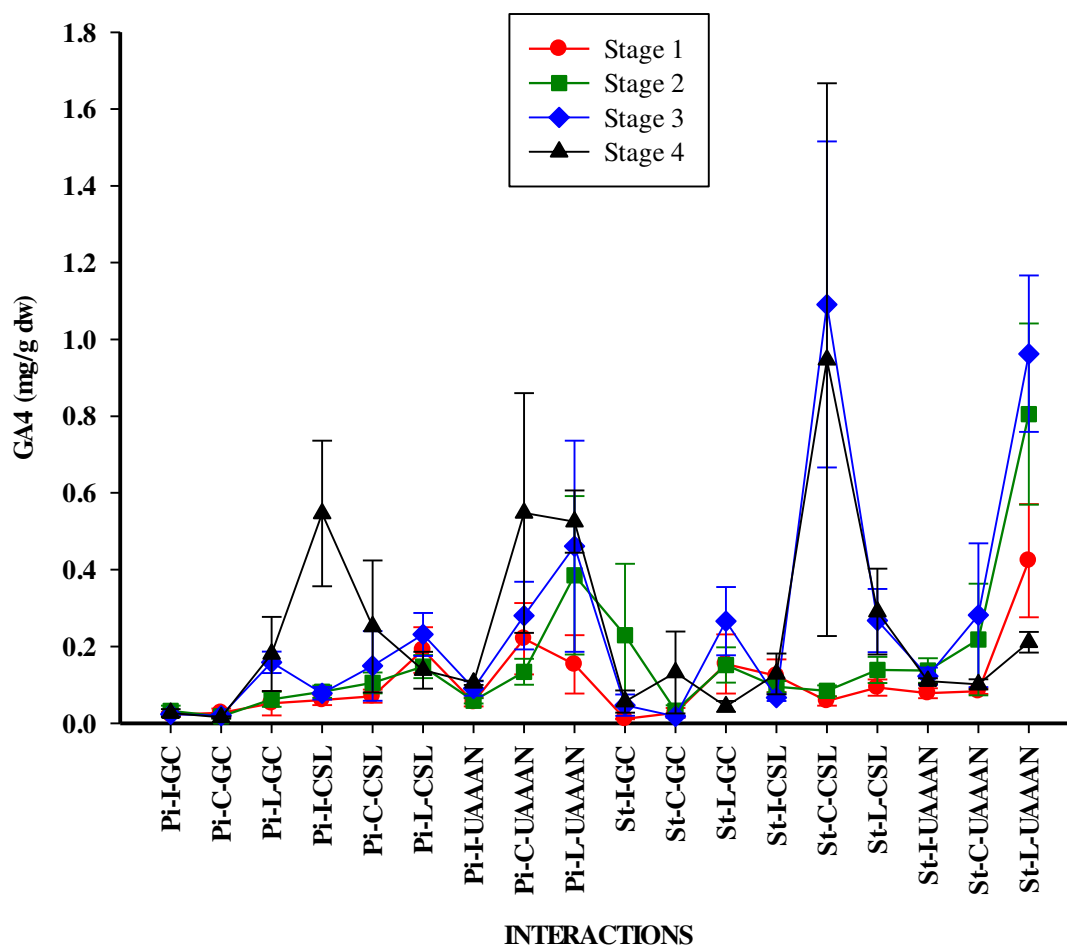


Fig. 1. Effect of sex x organ x locality interaction on the mean and standard error of the concentration of GA4 in *Dasyllirion cedrosanum* plant samples collected from three locations in Coahuila. (Pi) Pistillate, (St) Stamineate, (I) Inflorescence, (C) Crown, (L) Leaf, (GC) General Cepeda municipality, (SLC) San Lorenzo Canyon, (UAAAN) Antonio Narro Autonomous Agrarian University.

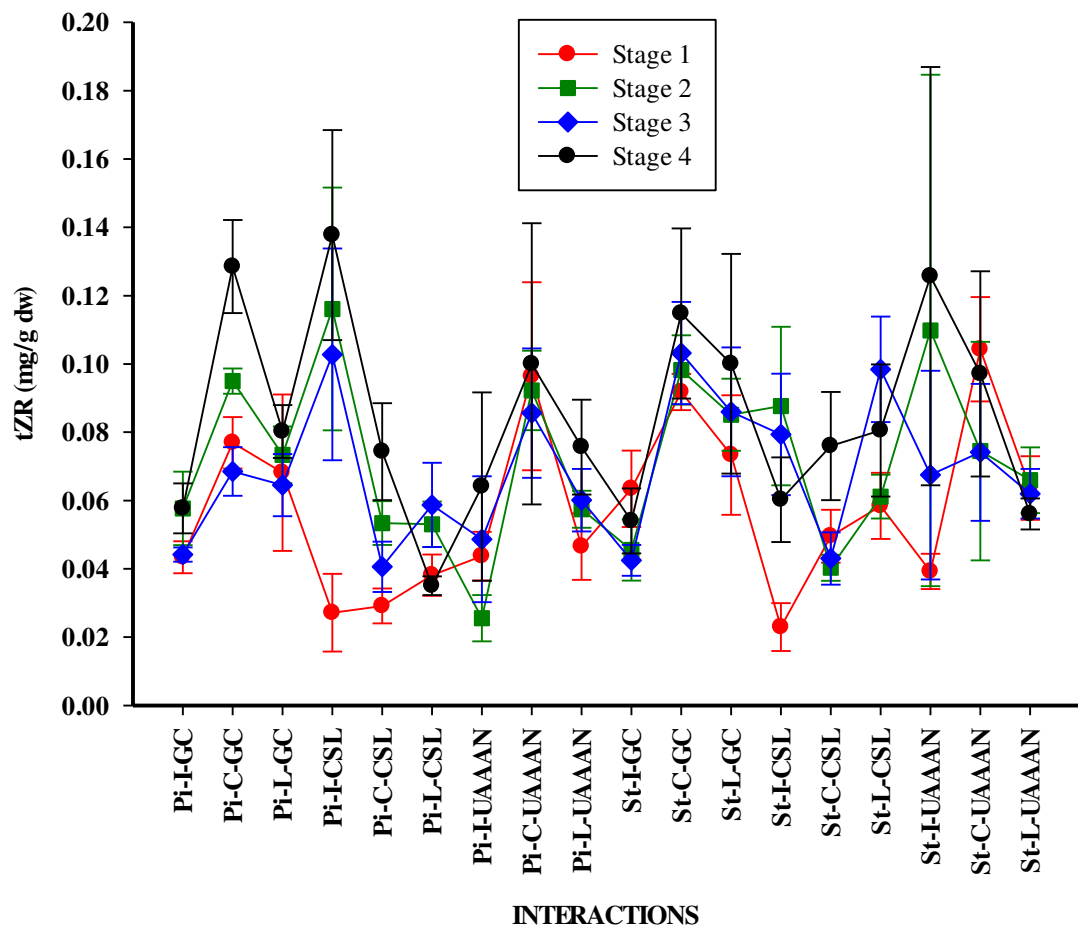


Fig. 2. Effect of sex x organ x locality interaction on the mean and standard error of the concentration of tZR in *Dasyliirion cedrosanum* plant samples collected from three locations in Coahuila. (Pi) Pistillate, (St) Staminate, (I) Inflorescence, (C) Crown, (L) Leaf, (GC) General Cepeda municipality, (SLC) San Lorenzo Canyon, (UAAAN) Antonio Narro Autonomous Agrarian University.

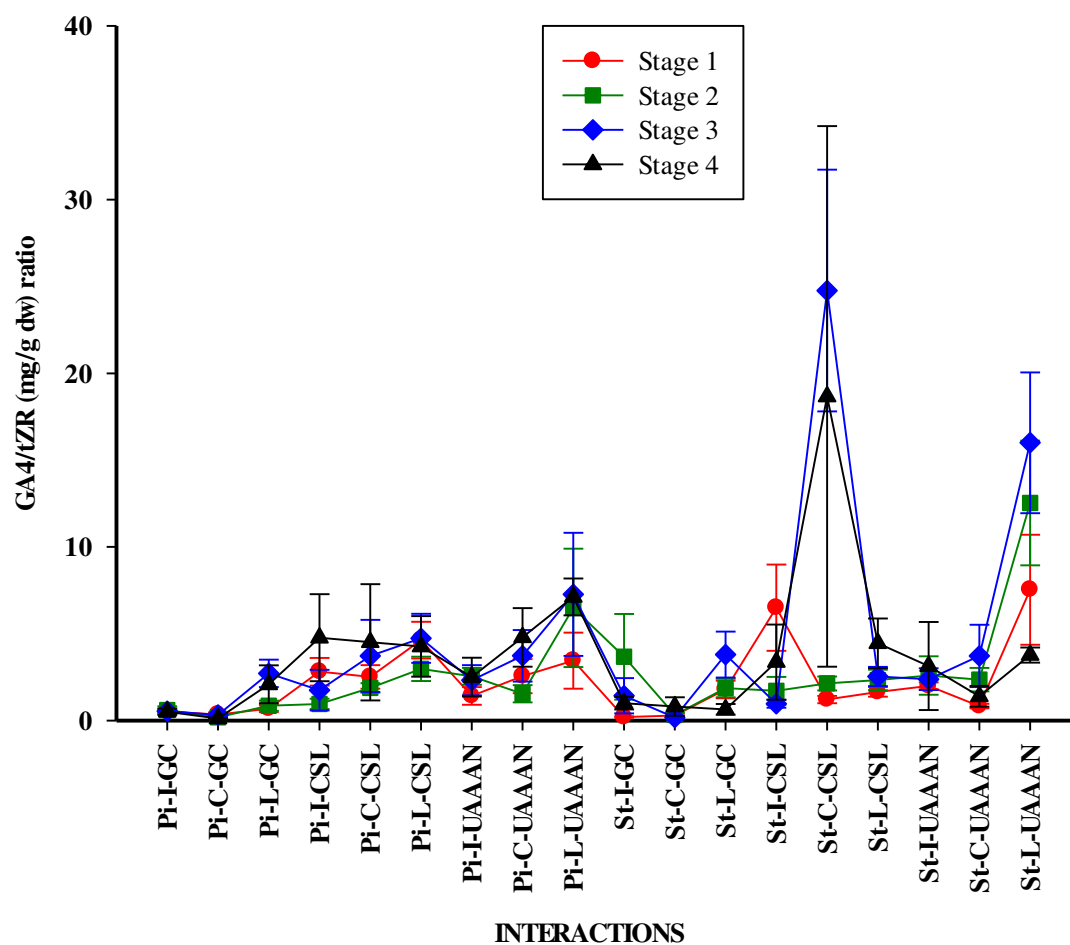


Fig. 3. Effect of sex x organ x locality interaction on the mean and standard error of the GA4/tZR ratio in *Dasyllirion cedrosanum* plant samples collected from three locations in Coahuila. (Pi) Pistillate, (St) Staminate, (I) Inflorescence, (C) Crown, (L) Leaf, (GC) General Cepeda municipality, (SLC) San Lorenzo Canyon, (UAAAN) Antonio Narro Autonomous Agrarian University.